

**Aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie
(Direktorin: Frau Prof. Dr. P. Ambrosch)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

**VERGLEICHENDE ANALYSE DER DIFFERENTIELLEN EXPRESSION
SPEZIFISCHER GENE IN PLATTENEPITHELKARZINOMEN AUS DEM
KOPF- UND HALS-BEREICH**

**Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel**

Kiel 2009

**vorgelegt von
NINA SIMONE SCOLA
aus Hamburg**

1. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. med. Martin Gramatzki

2. Berichterstatter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. Andreas Humpe

Tag der mündlichen Prüfung: 02. November 2009

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 02. November 2009

Meinen lieben Eltern und Jörg(i) gewidmet

I INHALTSVERZEICHNIS

II.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1	EINLEITUNG	1
1.1	Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region	1
1.2	Karzinogenese	1
1.3	Hintergrund	2
1.4	EGF-Rezeptor	3
1.5	c-Jun-N-terminale-Kinase 3	4
1.6	Insulinrezeptor	4
1.7	Lysyl oxidase-like 4	5
2	ZIELSETZUNG	6
3	MATERIAL UND METHODEN	7
3.1	Material	7
3.2	Methoden	7
3.2.1	Extraktion der RNA	7
3.2.2	Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration	8
3.2.3	Überprüfung der RNA-Integrität mittels Agarose-Gelelektrophorese	9
3.2.4	Northern-Hybridisierung	10
3.2.5	Arbeitsschritte zur Herstellung der Hybridisierungssonden	10
3.2.5.1	Reverse Transkription	10
3.2.5.2	Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	11
3.2.5.3	Markierung der RT-PCR-Produkte	12
3.2.6	Prähybridisierung	13
3.2.7	Hybridisierungsreaktion	14
3.2.8	Detektion	14
3.2.9	Densitometrische Auswertung der Genexpression	15
4	ERGEBNISSE	16
4.1	Vergleich der Genexpression in Kopf-Hals-Karzinomen mit benignen Tumoren und Schleimhautzellen	16
4.2	Expression einzelner Gene im Vergleich zueinander	18
4.3	Analyse der Genexpression bei unterschiedlichen TNM-Stadien	19
4.3.1	Expression der Gene in Abhängigkeit von der Ausdehnung des	

Primärtumors (T1-T4 ohne Tx)	19
4.3.2 Genexpression bei regionärer Lymphknotenmetastasierung (N0-N3)	20
4.3.3 Differentielle Expression bei Fernmetastasierung (M0 vs. M1)	21
4.4 Vergleich der Genexpression bei Primärtumoren und Metastasen	21
4.5 Beziehung der Genexpression zu Lokalisation, Alter und Geschlecht	22
5 DISKUSSION	25
5.1 EGFR	25
5.1.1 Expression von EGFR	25
5.1.2 EGFR-Hemmstoffe in der Karzinomtherapie	27
5.2 JNK3	28
5.2.1 JNK3 in der Gruppe der mitogen-aktivierten Proteinkinasen	28
5.2.2 Die JNK-Kaskaden und ihre Aktivatoren in der onkologischen Forschung	30
5.3 IR	31
5.3.1 IR und IGF1R	31
5.3.2 Das Insulin- und IGF-System bei Kopf-Hals-Karzinomen	33
5.3.3 Ausblick für onkologische Therapien im IR-System	35
5.4 LOXL4	36
5.4.1 Lokalisation und Funktion der Lysyl-Oxidasen	36
5.4.2 Lysyl-Oxidasen bei malignen Tumoren	36
5.5 Schlussfolgerung	38
6 ZUSAMMENFASSUNG	40
7 LITERATURVERZEICHNIS	41
8 ANHANG	60
9 DANKSAGUNG	64
10 LEBENS LAUF	65

II. Abkürzungsverzeichnis

C	Cytosin
CUP	cancer of unknown primary
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CSPD	Dinitrat-3-(4-Methoxyspiro 1,2 Dioxetane-3,2-[5-Chloro]Tricyclodecan-4-yl)Phenyl-Phosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-Triphosphat
dT	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	epidermal growth factor receptor (Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
ERBB1	erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 1
ERK	extracellular-signal regulated kinase
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-Protein	GTP-bindendes Protein
HER1	human epidermal growth factor receptor
HNO	Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
HB-EGF	Heparin-bindendes EGF
HPV	Humanes Papillomavirus
IGF	insulin-like growth factor
IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor
IGF-BP	IGF-binding protein
IR	Insulinrezeptor
JNK3	c-Jun-N-terminale Kinase 3
kb	Kilobasen
LOX	Lysyl-Oxidase
LOXL4	lysyl oxidase-like 4 (Isoform 4 der Lysyl-Oxidase)

mA	Milliampere
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MAPKK	mitogenaktivierte Proteinkinase-Kinase
MAPKKK	mitogenaktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase
mRNA	messenger RNA
MOPS	4- Morpholinpropansulfonsäure 3- Morpholinpropansulfonsäure
μJ	Mikrojoule
<i>p</i>	propability (Wahrscheinlichkeit)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF	platelet derived growth factor
<i>ras</i>	rat sarcoma (kleines G-Protein)
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkription
SAPK	stress activated protein kinase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	Sodium-Sodium-Citrat-Puffer
SH2	src-homology 2 (Proteininteraktionsdomäne mit struktureller Ähnlichkeit zur src-Proteinkinase)
src	sarcoma (Proteinkinase in der intrazellulären Signaltransduktion)
S	Svedberg
T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TGF	transforming growth factor
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TNM	tumor, nodus, metastases (Klassifizierung für maligne Tumoren)
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
v/v	volume per volume

1 Einleitung

1.1 Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region sind durch ein hohes Maß an aggressivem Wachstum und die hohe Bereitschaft zur Metastasierung charakterisiert. Im europäischen Raum sind sie die vierthäufigsten diagnostizierten Karzinome hinter Karzinomen der Lunge, der kolorektalen Region und der Prostata (Berrino und Gatta, 1998) und machen weltweit einen Anteil von 6-8 % aller Malignome aus (Schwab, 1994; Hoffmann et al., 1998). Ihre Genese ist weit überwiegend auf exogene Faktoren, in erster Linie chronischen Tabak- und/oder Alkoholabusus zurückzuführen (Biolchini et al., 2005; Chang et al., 2004). Humane Papillomaviren (HPV) als biologische Noxen spielen auch eine weitere relevante Rolle bei der Karzinogenese im oberen Aerodigestivtrakt, die mit den exogenen Noxen synergistisch wirken können (Zur Hausen, 1989; Syrjänen, 1990). So sind insbesondere die HPV-Typen 16 und 18 als „high-risk“ Faktoren beschrieben (Gillison, 2004).

Die wichtigste Ursache für die Mortalität ist die Metastasierung, d.h. die Fähigkeit der Tumoren, invasiv in das körpereigene Gewebe einzuwachsen und Tochterkolonien zu bilden.

1.2 Karzinogenese

Der Vorgang der Karzinogenese ist ein dynamischer und komplexer Prozess, der sich in mehreren Schritten vollzieht.

Auf molekularbiologischer Ebene steht am Anfang die Initiation. Biologische, physikalische oder chemische Noxen, genannt Karzinogene, führen hierbei zur irreversiblen Veränderung der DNA. Mit der Initiation eng verknüpft ist die Promotion, womit man die Hilfestellung sogenannter Synkarzinogene zur Transformation der benignen in eine maligne Zelle meint. Im nächsten Schritt erfolgt die klonale Expansion der entstandenen Tumorzelle.

Bei den Kopf-Hals-Karzinomen spricht man entsprechend der Mehrschrittttheorie der Krebsentstehung von der Dysplasie-Karzinom-Sequenz. Hierunter versteht man die Entstehung von Zelltypen in einem Epithelverband, deren Anteil in drei Dysplasiestufen sukzessiv zunimmt, bis schließlich alle gesunden Epithelzellen ersetzt sind (Böcker et al., 1997). Die letzte Stufe, in der die Basalmembran noch intakt ist, wird „Carcinoma in situ“ genannt. Erst wenn die Tumorzellen die Basalmembran durchdringen, können sie lymphogen und/oder hämatogen metastasieren.

Es entstehen mikroskopisch sichtbare Tumorherde, die die Stadien der Progression (makroskopische Sichtbarkeit), Invasion und schließlich der Metastasierung durchlaufen (Bleich et al., 1995).

1.3 Hintergrund

Die unter den malignen Tumoren der Kopf-Hals-Region weit überwiegenden Plattenepithelkarzinome (>90 %) weisen eine über die letzten Jahrzehnte weiterhin zu beobachtende Zunahme auf. Hinzu kommt eine unverändert schlechte Prognose dieser Erkrankung, die trotz radikaler chirurgischer Techniken und trotz Modifikationen der Strahlen- und Chemotherapie nicht verbessert werden konnte. Vor diesem Hintergrund erklärt sich die Notwendigkeit, Tumorparameter zu identifizieren, die bei entsprechender Wertigkeit dazu beitragen können, die Prognose von Patienten besser einschätzen zu können und die Therapie speziell abzustimmen.

In vorangegangenen Untersuchungen wurden in der HNO-Klinik Kiel vergleichende Genexpressionsanalysen durchgeführt, um Gene zu finden, die für Kopf-Hals-Karzinome charakteristische Expressionsmuster aufweisen. Auf diese Weise gelang der Nachweis mehrerer Gene, von denen vier Gene, das Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor(EGFR)-Gen, das c-Jun-N-terminale-Kinase-3(JNK3)-Gen, das Insulinrezeptor(IR)-Gen und das Gen einer Isoform der Lysyl-Oxidase (LOXL4) in dieser Arbeit weiter analysiert werden. Diese Gene kodieren für Proteine unterschiedlicher Funktion, die im Zellstoffwechsel zentrale Rollen spielen.

1.4 EGF-Rezeptor

Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) ist ein Zytokin, das in Hirn, Niere und Speicheldrüse produziert wird und mitogen auf Zellen wirkt. Seine Wirkung wird vermittelt über EGFR, eine Tyrosinkinase. Er zählt zur Erb/Her-Familie der Tyrosinkinasen und wird daher auch mit ErbB1/HER1 bezeichnet. EGFR spielt eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion bei der embryonalen Entwicklung und beim differenzierten Gewebe (Haley, 1990).

Er ist beteiligt an der Regulierung von Zelldifferenzierung (Boonstra et al., 1985), Zellproliferation (Chen et al., 1987) und Zellmigration (Barrandon und Green, 1987).

Der Rezeptor ist an der Oberfläche von fast allen menschlichen Zellen zu finden, insbesondere in der Keimschicht von Epithelgewebe, dem Stratum basale, so auch in der Basalzellschicht des gesunden Mukosaepithels in Mundhöhle und Larynx (Christensen, 1998).

Der Rezeptor besteht aus einer extrazellulären Ligandenbindungsstelle, einer transmembranen Helix und einer intrazellulären Tyrosinkinase. Bei Aktivierung durch einen extrazellulären Liganden dimerisieren zwei Rezeptoren, wodurch die Tyrosinkinase zur Autophosphorylierung des Rezeptors angeregt wird (Sako et al., 2000). An den entstandenen Phosphotyrosinresten können Proteine mit entsprechender Protein-Interaktionsdomäne, der sog. Src-homology2(SH₂)-Domäne, andocken und so aktiviert werden. Mittels Proteinkaskaden werden über das kleine G-Protein *ras* und andere Schlüsselproteine die Genexpression reguliert und so die Zellteilung initiiert (Löffler, 2001). Mindestens fünf Liganden können den Rezeptor aktivieren, darunter EGF, transforming growth factor α (TGF- α) und Heparin-bindendes EGF (HB-EGF; Wells, 1999). Jedoch ist eine Signaltransduktion auch durch Mutationen des Rezeptors oder durch Steigerung der basalen Rezeptoraktivität, vermittelt durch intrazelluläre Signalwege, möglich (Khazaie et al., 1993).

Die Expression von EGFR wird in gesundem Gewebe durch EGF, TGF und andere Wachstumsfaktoren wie der platelet derived growth factor (PDGF) herunterreguliert (St-Arnaud et al., 1984).

EGF und auch EGFR werden in vielen Tumoren überexprimiert (Goustin et al., 1986), so auch in Kopf-Hals-Karzinomen (Mrhalova et al., 2005; Salomon et al., 1995).

1.5 c-Jun-N-terminale-Kinase 3

Die JNK3 gehört zu der Gruppe der mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPKs). Diese sind Bestandteil von vielen zentralen intrazellulären Signalkaskaden (Pelech et al., 1993). Das besondere biochemische Merkmal der MAPKs ist ihre Aktivierung durch die MAPK-Kinase mittels gleichzeitiger Phosphorylierung von Tyrosin und Threonin (Nishida und Gotoh, 1993). Die MAPKs selbst wiederum aktivieren ihre Substrate mittels Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten.

Im Verlauf der MAPK-Kaskade kommt es zur Aktivierung einer MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK), die eine MAPK-Kinase (MAPKK) aktiviert. Diese wiederum phosphoryliert eine MAPK, zu denen auch die in dieser Arbeit untersuchte JNK3 zählt. Fast allen Rezeptoren der Zelloberfläche sind eine oder mehrere intrazelluläre MAPK-Signalkaskaden nachgeschaltet (Robinson und Cobb, 1997). Als Auslöser dieser Kettenreaktion kommen Stimuli verschiedener Art in Frage wie Zytokine, Wachstumsfaktoren, Veränderungen der extrazellulären Osmolarität und Bestrahlung (Widmann et al., 1999).

Die unterschiedlichen Mitglieder der MAPK-Familie sind an der Regulation von verschiedenen Funktionen aus den Bereichen des Immunsystems, metabolischer Homöostase, Zellteilung und Reaktionen auf zellulären Stress beteiligt (Dickinson und Keyse, 2006). Sie scheinen ebenso eine wichtige Rolle bei Apoptose und Tumorsuppression zu spielen (Bulavin und Fornace, 2004).

1.6 Insulinrezeptor

Der IR ist ein tetrameres Transmembranprotein mit der Struktur $\alpha_2\beta_2$, der ebenso wie EGFR zu der Familie der Tyrosinkinasen zählt. Insulin bindet an die beiden extrazellulären α -Untereinheiten, woraufhin es zur Autophosphorylierung durch die Tyrosinkinase der transmembranalen β -Untereinheiten kommt (Seta et al., 1993). Anschließend werden Tyrosylreste des IR-Substrat-1, das mittels SH2-Domänen an die β -Untereinheiten andockt, phosphoryliert. In der Folge kommt es durch eine intrazelluläre Signalkaskade zu einer Vielzahl von Prozessen (Goldstein, 1993). Die Expression von IR, insbesondere seine A-Isoform, ist bei Malignomen von Kolon,

Prostata, Leber und Mamma erhöht (Belfiore, 2007). Auch in Kopf-Hals-Karzinomen fanden Maune und Görögh überhöhte IR-mRNA-Expression (Maune und Görögh, 2000).

1.7 Lysyl oxidase-like 4

Das Enzym Lysyl-Oxidase (LOX) und vier ihr ähnliche Isoformen (LOXL, LOXL2, LOXL3 und LOXL4) sind kupferabhängige Aminoxygenasen, die zunächst als Enzyme des Extrazellulärspaces bekannt wurden (Molnar et al., 2003). Hier katalysieren sie die Vernetzung von Kollagen und Elastin und tragen so zur Stabilisierung der extrazellulären Matrix bei (Kagan und Trackman, 1991; Rucker et al., 1998; Maki et al., 2005; Rodriguez et al., 2002; Szauter et al., 2005). Erst später wurden auch die intrazellulären, sogar intranukleären Funktionen erkannt (Kagan und Li, 2003). So regulieren diese Enzyme Zellwachstum, Migration, Zelladhärenz und Tumorsuppression (Csiszar, 2001; Payne et al., 2007). Die in dieser Arbeit untersuchte LOXL4 ist das zuletzt entdeckte Enzym dieser Aminoxygenasefamilie. Die höchsten Konzentrationen der zugehörigen mRNA finden sich in Skelettmuskel, Pankreas und Hoden (Maki et al., 2001).

Die Expression der hier aufgeführten Gene wird erstmals vergleichend und in Zusammenhang mit Kopf-Hals-Karzinomen untersucht. Die sich daraus ergebenden Resultate sollen Anhaltspunkte dafür liefern, dass die unterschiedliche Expression dieser Gene bei der Entstehung oder Progression der Kopf-Hals-Karzinome eine Bedeutung haben.

2 Zielsetzung

Es war das Ziel der vorliegenden Untersuchung, die differentielle Expression von vier Genen (EGFR, JNK3, IR und LOXL4) in 58 Kopf-Hals-Karzinom-Biopsaten zu analysieren. Vor dem Hintergrund dieser Analyse sollten folgende Arbeitsschritte ausgeführt werden:

- 1.) Zur Untersuchung dieser Gene soll aus den Homogenaten von schockgefrorenen Karzinombiopsaten die RNA extrahiert und elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Detektion der einzelnen Gene soll mit der Northern-Hybridisierungsmethode durch den Einsatz Digoxigenin(DIG)-markierter genspezifischer Sonden erfolgen.
- 2.) Zum Vergleich der Höhe der Expression dieser Gene werden gesunde Schleimhautbiopsate und Epithelzellkulturen des oberen Aerodigestivtraktes simultan untersucht und das Expressionsprofil der einzelnen Gene untereinander verglichen.
- 3.) Um festzustellen, ob sich zwischen den hier untersuchten Genen und dem retrospektiv ausgewerteten Patientengut eine Beziehung ergibt, soll die Genexpression unter Berücksichtigung von verschiedenen klinisch-histopathologischen Parametern wie TNM-Stadium, Geschlecht und Alter bei Biopsatentnahme ausgewertet werden.
- 4.) Schließlich soll die Frage diskutiert werden, inwiefern die unterschiedliche Expression dieser Gene bei der Genese oder Progression der Kopf-Hals-Karzinome eine Rolle spielen kann und ob sich daraus therapeutische Ansätze ergeben.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Die Analyse der Expression der EGFR-mRNA, JNK3-mRNA, IR-mRNA und LOXL4-mRNA erfolgte in 58 Kopf-Hals-Karzinom-Biopsaten. Das Alter und Geschlecht der Patienten und die klinischen Parameter der Karzinome sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst. Zu Kontrolluntersuchungen diente mRNA aus 4 Mundschleimhautbiopsaten von benignen Tumoren und aus 7 Epithelzellkulturen. Diese wurden aus gesunder Mundschleimhaut von Probanden in der HNO-Klinik Kiel gewonnen und nach der Methode von Saffran und Mitarbeitern isoliert (1997). Für die Entnahme der Tumor- und Schleimhautbiopsate lag eine schriftliche Zustimmung der Patienten in Form einer von der Ethikkommission der Kieler Universitätsklinik befürworteten Aufklärung vor.

3.2 Methoden

3.2.1 Extraktion der RNA

Die Gewebestücke wurden zunächst mit einem sterilen Skalpell in 2-3 mm³ Stücke zerteilt, im Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend mechanisch im sterilen Keramikmörser zu Pulver gemahlen. Es wurde 1 ml TRIZOL[®] (Gibco, Ingolstadt) hinzugegeben. Durch wiederholtes Auf- und Abziehen mit einer 1-ml-Einmalspritze (Plastipak[®], Becton-Dickinson, Heidelberg) mit Kanüle (Microlance[®] Nr. 2, Becton-Dickinson) wurde die Lösung des Gewebes im Reagenz gefördert.

Alle Homogenate wurden in 1,5-ml-Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nürnberg) zur Weiterverarbeitung überführt. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA), Mischen für 15 Sekunden und Inkubation bei Raumtemperatur für 2 - 3 Minuten erfolgte eine Zentrifugation der Homogenate (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg) bei 12000 U/min und 4 °C Temperatur für 15 Minuten.

Hierdurch wurde die Lösung in eine untere Chloroform-Phenol-Phase, die DNA und Proteine sowie Membranbestandteile enthielt, eine Interphase aus teilweise gefällter DNA und eine wässrige obere Phase mit RNA getrennt. Die mittlere und untere Phase wurden verworfen, die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß mit 500 µl Isopropanol (Sigma-Aldrich) und 1 µl Glycogen (Gibco) überführt. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und 10-minütiger Zentrifugation bei 12000 U/min und 4 °C wurde die RNA durch Isopropanol präzipitiert. Die RNA wurde dann in 1 ml 75%igem Ethanol (Sigma-Aldrich) gewaschen, bei 7500 U/min für 5 Minuten zentrifugiert und sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert. Das RNA-Pellet wurde im offenen Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur unter dem Abzug 10 bis 20 Minuten getrocknet, in 11 µl 50%igem Formamid (Sigma-Aldrich) aufgenommen und bei Kühlschranktemperatur (4 °C) gelöst. Falls keine sofortige Weiterverarbeitung stattfand, erfolgte die Lagerung der RNA bei –80 °C.

Zur Ausfällung der RNA wurde die wässrige Phase 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 10 Minuten bei 12000 U/min bei 4 °C zentrifugiert. Das am Boden des Zentrifugenröhrchens entstandene RNA-Pellet wurde in 1 ml 70%igen Ethanol gewaschen und erneut über 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet 20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl 50%igem (v/v) Formamid gelöst.

3.2.2 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration der Proben wurde mit Hilfe eines UV-Spektralphotometers (Uvikon 931, Kontron, Neufahrn) bestimmt. Gemessen wurde die Absorption jeder Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm gegenüber einem Leerwert bei 50%igem Formamid. Vor jeder Messung wurden die Quarzglas-Küvetten (Suprasil, Hellma, Müllheim) durch wiederholtes Spülen mit Aqua dest. gereinigt und anschließend mit einer Druckluftpistole getrocknet. Aus der ermittelten Absorption ließ sich nach dem Lambert-Beer-Gesetz die Konzentration der gesamten RNA errechnen. Das Lambert-Beer-Gesetz lässt sich bei konstanter Wellenlänge, konstanter Schichtdicke der Küvetten von 1 cm und gleich bleibender Eingangslichtintensität auf die Formel $C = A \times f$ vereinfachen (Jahrreiß und Neuwirth, 1993) wobei C der Konzentration der

Probe in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, A der Absorption und f einem Umrechnungsfaktor entspricht, der bei RNA 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ beträgt.

3.2.3 Überprüfung der RNA-Integrität mittels Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung des Agarosegels wurden 1,2 g Agarose (Merck, Darmstadt) und 2 ml 50x Tris-Acetate-EDTA-Puffer(TAE)-Puffer in 100 ml Aqua dest. überführt und die Flüssigkeit in der Mikrowelle aufgekocht (Zusammensetzung von TAE: 1 M Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan, 57,1 ml konzentrierter Essigsäure, 100 ml 0,5 M Ethylendiamintetraessigsäure [EDTA; pH 8,0] aufgefüllt mit Aqua dest. auf 1000 ml). Die warme Gellösung, zu der noch 10 μl einer 1%igen Ethidiumbromidlösung zur Färbung der RNA zugeführt wurde, wurde in einen Trägerschlitten gegossen und durch Abkühlung auf Zimmertemperatur erhärtet. Nach Überführung des Gels in die Elektrophoresekammer wurde es mit dem Laufpuffer (20 ml 50x TAE in 1000 ml Aqua dest.) bedeckt. Es wurden jeweils 20 μl (= 10 μg RNA) in die Taschen des Gels eingebracht. Die Proben wurden bei einer Spannung von 80 V über 60 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt (Horizon 11.4, Horizontal Gel Electrophoresis, Life Technologies, Gaithersburg, USA). Die durch das Ethidiumbromid angefärbte rRNA wurde durch UV-Licht visualisiert. Im Falle der nicht-degradierten rRNA, die den größten Anteil an der gesamten RNA-Menge einnimmt, zeigte sich im Agarosegel mit zwei Fragmenten im Bereich von 5 kb (28S-rRNA) und 2 kb (18S-rRNA, Abb. 3-1). Die Integrität der rRNA ließ Rückschlüsse auf die Integrität der Gesamt-RNA zu. Degradierete Proben ohne deutliche Banden wurden für weitere Arbeitsschritte nicht berücksichtigt.

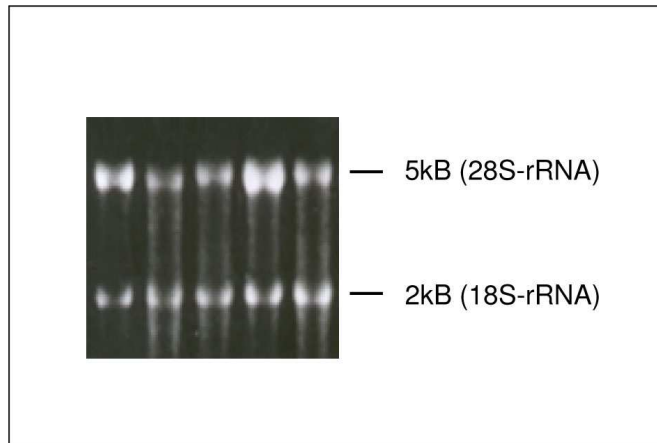


Abb. 3-1. Exemplarische Darstellung des elektrophoretischen Nachweises der Integrität der RNA. Die Banden der beiden rRNA-Fragmente sind deutlich sichtbar. Dies gilt als indirekter Nachweis dafür, dass auch die mRNA intakt ist.

3.2.4 Northern-Hybridisierung

Es wurden jeweils 10 µg RNA aus allen zu untersuchenden Biopsaten (siehe Kap. 3.1) für die Elektrophorese in einem 1,2%igen Agarosegel mit 1 Volumenanteil 50-fach 4-Morpholinpropansulfonsäure (MOPS) und 2 % (v/v) 0,22 M Formaldehyd eingesetzt. Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten RNA-Fractionen aus dem Gel unter Zuhilfenahme einer Vakuumpumpe (Stratagene Vacuublot, Heidelberg) nach 90 Minuten bei 60 mbar Unterdruck auf eine positiv geladene Nylonmembran (Böhringer-Mannheim, Mannheim) übertragen. Die Membran wurde dann in 1/10 einer 20-fachen Sodium-Sodium-Citrat-Puffer(SSC)-Lösung (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7) gewaschen und die RNA durch Bestrahlung in einem UV-Crosslinker (Stratalinker, Stratagene) bei 1200 µJ auf der Membran fixiert.

3.2.5 Arbeitsschritte zur Herstellung der Hybridisierungssonden

3.2.5.1 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurden zwei verschiedene Ansätze erstellt. Der erste Ansatz bestand aus 1 µl RNA-Probe, 1 µl 25 µM Oligo-Desoxythymidin(dT)-

Downstream-Primer und 6 µl 2%igem Diethylpyrocarbonat(DEPC)-haltigen Wasser. Er wurde in einem Thermocycler (DNA Thermal Cycler 480, Perkin Elmer, Norwalk, USA) für zehn Minuten auf 70 °C erhitzt und unmittelbar danach auf Eis gelagert. Der zweite Ansatz setzte sich aus 4 µl 5x1st Strand Buffer, 2 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT), 5 µl 2 mM 2'-Desoxynucleosid-5'-Triphosphate (dNTPs) und 1µl SuperScript II (Roche Diagnostics, Mannheim) zusammen. Beide Ansätze wurden vermischt. Das entstandene Gemisch von insgesamt 20 µl wurde für 15 Minuten auf 37 °C erwärmt. Nachfolgend wurde es für 45 Minuten auf 44 °C und zum Schluss für 15 Minuten auf 70 °C erhitzt. Die fertige cDNA wurde bei -20 °C eingefroren.

3.2.5.2 Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Mittels RT-PCR unter Einsatz genspezifischer Oligonukleotide wurden definierte Genabschnitte amplifiziert, die bei der Hybridisierung als Hybridisierungssonden dienen sollten. Die für die Amplifikation der einzelnen Gene verwendeten Oligonukleotidsequenzen sind in Tabelle 3-1 angegeben.

Tabelle 3-1 Oligonukleotide für die Amplifikation der fünf untersuchten Gene

Gen	Sense (5'-3')	Antisense (5'-3')	Länge der Amplikons (bp)
GAPDH ¹	CCAGCCGAGCCACATCGC	ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT	360
IR	CGACTGGTCCCGTATCCTG	CAGGTGTGTGGAGACCTG	316
EGFR	CTCTGGATCCACAGGAAGT	GTGGCACTGTATGCACTCAG	501
JNK3	CTGTATTGCAGCTAAGCTC	CTACATCTTCAAGGGTCTG	535
LOXL4	TCACAACTGGCAGAGAACC	TATCCCACTTGAGCAAGAGC	639

¹ GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) ist ein konstitutiv exprimiertes Housekeeping-Gen, dessen Expression als Grundlage für die Auswertung diente (vgl. 3.2.9)

Für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden 5 µl 10x PCR-Puffer (Qiagen, Hilden), 1 µl dNTP (jeweils 10 mM), 1,5 µl MgCl₂ (25 mM), je 1 µl 50 µM Sense- und Anti-Sense-Primer, 0,5 µl *Taq*-Polymerase und 2 µl aus der reversen Transkription stammenden cDNA (s. 3.2.5.1) verwendet und das Reaktionsvolumen mit Aqua dest. auf 50 µl aufgefüllt.

Die Ansätze wurden in einem Thermocycler (T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen) verschiedenen Temperatur-Zeit-Intervallen unterzogen. Zu Beginn wurde für drei Minuten auf 94 °C erhitzt. Von den nun nachfolgenden Inkubationsschritten wurden 30 Zyklen durchgeführt: Im ersten Schritt wurden die Proben für 45 Sekunden auf 94 °C erhitzt, um die cDNA-Stränge zu denaturieren. Im zweiten Schritt wurden sie zwei Minuten auf 62 °C gekühlt, um ein Anlagern des Primers an den nun einzeln vorliegenden DNA-Strang zu erreichen. Zuletzt wurde die Temperatur für 90 Sekunden auf 72 °C erhöht. In diesem Schritt wurde die DNA amplifiziert. Nach Beendigung des letzten Zyklus wurde mit einem fünfminütigen Extensionsschritt bei 72 °C die Herstellung doppelsträngiger DNA komplettiert. Die fertigen PCR-Produkte wurden einer anschließenden Gelelektrophorese unterzogen (vgl. 3.2.3).

3.2.5.3 Markierung der RT-PCR-Produkte

Die Herstellung der Hybridisierungssonden erfolgte aus den RT-PCR-Produkten durch deren spezifische Markierung. Zu dieser mittels PCR durchgeführten Markierungsreaktion wurden 1 µl eines 1:10 verdünnten Amplifikationsproduktes (s. 3.2.5.2) als DNA-Template und das Digoxigenin(DIG)-Probe-Synthesis-Kit (Roche, Mannheim) nach Protokoll des Herstellers verwendet. In dem dNTP-Gemisch war mit DIG verknüpft Desoxyuridintriphosphat (dUTP) enthalten, das in die entstehenden DNA-Moleküle eingebaut wurde. Neben den markierten Sondenansätzen wurden auch Kontrollansätze mit nicht-markierten Reaktionskomponenten vorbereitet. Nach der PCR wurden die Reaktionsprodukte und ein DNA-Molekularstandard auf ein 1,2%iges Agarosegel aufgetragen und bei 80 V mittels Elektrophorese aufgetrennt. Nach optischer Kontrolle in einem UV-Spektrometer (BioDocII®, Biometra) wurde die mit Ethidiumbromid markierte DNA-Fraktion herausgeschnitten und in ein 1,5-ml-Tube transferiert. Pro 10 mg Gel wurden 10 µl eines acetat- und chaotrophaltigen

Puffers (Roche Diagnostics) hinzugefügt. Nach Vortexen wurde der Ansatz bis zum Schmelzen in einem 60 °C warmen Schüttelwasserbad für ca. 20 Minuten inkubiert. Es folgte eine kurze Zentrifugation (Centrifuge 5417 R, Eppendorf, Köln) bei 14000 U/min und Gewinnung der DNA mittels DNA-Purification-Kit (Biometra). Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung wurde die Sonden-DNA (25 ng/ml) 10 Minuten bei 100 °C denaturiert, dann sofort auf Eis gekühlt.

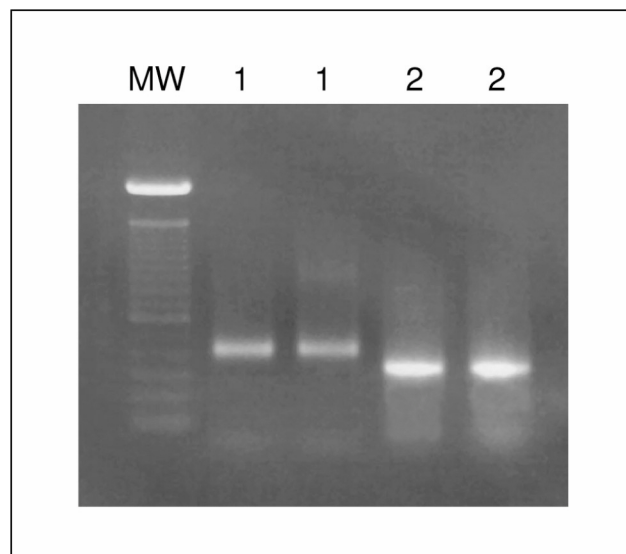


Abb. 3-2. Exemplarische Darstellung des elektrophoretischen Nachweises von dUTP-markierten (1) und nicht-markierten (2) RT-PCR Produkten. Durch den Einbau von dUTP erhöht sich das Molekulargewicht der DNA, wodurch sie im Agarosegel eine kürzere Trennstrecke zurücklegt. Die markierte DNA wurde aus dem Gel isoliert, aufgereinigt und als Sonde für die Hybridisierung verwendet. (MW: Molekularstandard)

3.2.6 Prähybridisierung

Nach der Fixierung der RNA-Banden auf der Nylonmembran (s. 3.2.4) wurde diese in ein Bachofer-Glasrohr (Biometra) überführt und für zwei Stunden in 20–30 ml vorgewärmter DIG Easy Hyb-Lösung (Roche) bei 50 °C in einem Hybridisierungssofen (Compact Line OV4, Biometra) prähybridisiert.

3.2.7 Hybridisierungsreaktion

Diesem Schritt folgte die Hybridisierung. Es wurden 50 ng/ml des in 3.2.5.3 beschriebenen Markierungsgemisches für 10 Minuten in kochendem Wasser denaturiert und sofort auf Eis gekühlt. Die denaturierte Probe wurde mit der auf 50 °C vorgewärmten DIG Easy Hyb Prähybridisierungslösung vermischt und auf die Membran aufgetragen. Die Hybridisierungsreaktion wurde für 12-16 h bei einer Temperatur von 50 °C durchgeführt.

3.2.8 Detektion

Die Nylonmembran wurde nach der Hybridisierung jeweils 2x5 Minuten in Waschlösung (2xSSC, 0,1 % Sodiumdodecylsulfat (SDS)) schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgte eine zweimalige Inkubation in 5x Waschlösung (0,5 % SSC, 0,1 % SDS) bei 68 °C für jeweils 15 Minuten. Zur Equilibrierung schloss sich eine fünfminütige Inkubation in Waschpuffer an, bestehend aus 0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, 0,3 % Tween 20 und Aqua dest. ad 500 ml bei pH 7,5. Danach wurde die Membran mit Blocking-Lösung (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5) über 30 Minuten geblockt. Es folgte die Inkubation der Membran in einer 1:10.000 verdünnten anti-DIG-AP-Antikörperlösung (Roche) über 45 Minuten. Anschließend wurde sie zweimal für 15 Minuten in 5xWaschpuffer (s.o.) gewaschen. Zum Equilibrieren reihte sich eine fünfminütige Inkubation in einer Lösung mit folgender Zusammensetzung an: 0,1 M Tris/HCl, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9,5. Die Nylonmembran wurde nun auf eine Plastikfolie gelegt, mit 1 µl Dinitrat-3-(4-Methoxyspiro-1,2-Dioxetane-3,2-(5-Chloro)Tricyclodecan-4-yl)Phenyl-Phosphat (CSPD; Roche), beträufelt, mit einer weiteren Folie luftblasenfrei abgedeckt und unter Lichtabschluss für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Ausstreichen der CSPD-Lösung wurden die Folien verschweißt und 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. In der Dunkelkammer wurde die Membran auf der RNA-tragenden Seite mit einem Röntgenfilm (XAR-5 Kodak, Rochester, New York, USA) abgedeckt, in eine Röntgenkassette gelegt und über eine Zeitdauer von 5 - 20 Minuten belichtet.

3.2.9 Densitometrische Auswertung der Genexpression

Um eine Aussage über die Höhe der Expression der einzelnen Gene treffen zu können, wurden die auf dem Röntgenfilm sichtbaren Hybridisierungssignale einer densitometrischen Messung unterzogen. Hierzu wurden die Fragmente durch das Photo-Dokumentationssystem BioDocII®, (Biometra) unter Anwendung der Software Herolab E.A.S.Y. Win32 (Herolab, Wiesloch) ausgewertet. Wie unter 3.2.3 beschrieben, wurden nur solche Tumor-RNA-Proben für die Analyse eingesetzt, in denen die beiden rRNA (18S- und 28S-rRNA)-Banden klar und deutlich abgegrenzt nachweisbar waren. In jeder dieser Proben war auch eine klare Bande des konstitutiv exprimierten „Housekeeping“-Gens GAPDH nachgewiesen.

Die Bandenintensität des GAPDH-Gens diente in jeder Probe als Bezugsgröße zur Bestimmung der Höhe der Expression der vier Gene (IR, EGFR, JNK3, LOXL4), die nach Intensität und Ausdehnung in folgende 4 Stufen eingeteilt wurden (siehe auch Abb. 3-3): keine Expression (-), schwache Expression (+), mittlere Expression (++) und starke Expression (+++).

Zur Datenanalyse wurde der Exakte Test nach Fisher angewendet. Sie erfolgte in Hinblick auf verschiedene Subkriterien (benigne vs. maligne Proben, TNM-Stadium, Primärtumoren vs. Metastasen, Lokalisation, Alter und Geschlecht). Für alle *p*-Werte galt das 95%-Konfidenzintervall.

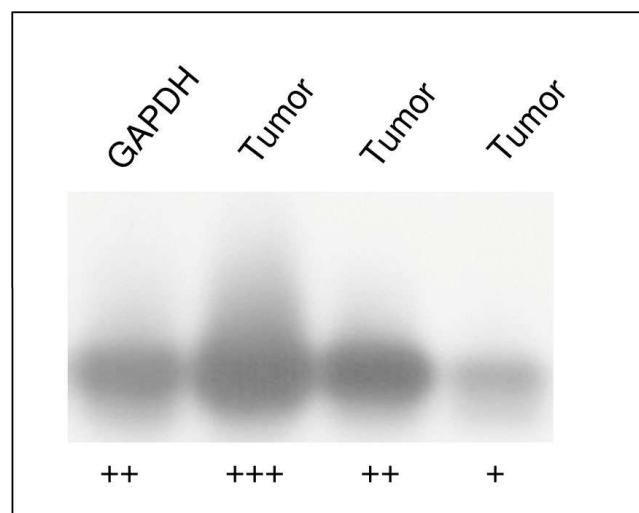


Abb. 3-3. In verschiedene Stufen (Pluszeichen) eingeteilte Bandenintensitäten, die densitometrisch gemessen wurden. Als Bezugsgröße diente in jeder Probe die Bandenstärke des konstitutiv exprimierten GAPDH-Gens (exemplarische Darstellung).

4 Ergebnisse

4.1 Vergleich der Genexpression in Kopf-Hals-Karzinomen mit benignen Tumoren und Schleimhautzellen

Anhand der in Tabelle 4-1 aufgeführten Daten ließ sich die Häufigkeit und die unterschiedliche Ausprägung der Expression einzelner Gene zusammenstellen. Demnach betrug die Expression des EGFR-Gens in den Karzinombiopsaten 78 % und in den benignen Proben 36 % ($p = 0,01$). Die Höhe der Expression des IR-Gens bei den Tumorproben war mit 79 % vergleichbar mit der des EGFR-Gens. Es zeigte sich jedoch, dass der prozentuale Anteil der IR-Genexpression in den benignen Proben mit 73 % fast so hoch war wie in den Karzinombiopsaten. Dieser geringfügige Expressionsunterschied erwies sich als nicht signifikant ($p = 0,7$). Die Expression des JNK3-Gens war in den Karzinomproben deutlich reprimiert mit nur 12 % positiver Proben im Vergleich zu 46 % bei den benignen Proben ($p = 0,02$). Schließlich ließ sich ein hochsignifikanter Unterschied feststellen zwischen der LOXL4-Genexpression in den Karzinombiopsaten mit 71 % im Vergleich zu 9 % bei den benignen Proben ($p = 0,0002$). Zwar lag die Häufigkeit der LOXL4-Genexpression in den Karzinomproben nicht höher als die der EGFR- oder IR-Genexpression, jedoch war der prozentuale Unterschied zwischen der LOXL4-Genexpression bei malignen und benignen Proben unter den vier untersuchten Genen am größten.

Die 11 benignen Proben setzten sich aus 7 Schleimhautzelllinien und 4 Biopsaten von benignen Tumoren (2 Papillome und 2 Adenome) zusammen. Die Genexpression beider Subgruppen wurde aufgeschlüsselt.

Die Expression des IR-Gens war in allen 4 und die des EGFR-Gens in 2 benignen Tumoren nachweisbar. Das JNK3- und dem LOXL4-Gen wurden in den benignen Tumoren nicht exprimiert (EGFR: 50 %, JNK3: 0 %, IR: 100 %, LOXL4: 0 %). Es zeigte sich eine abweichende Expression im Vergleich mit den benignen Epithelzelllinien (EGFR: 29 %, JNK3: 71 %, IR: 57 %, LOXL4: 14 %).

Die LOXL4-Genexpression zeigte bei Vergleich der 4 benignen Tumoren mit den malignen Proben einen signifikanten Unterschied ($p = 0,01$), die Expression der anderen drei untersuchten Gene waren nicht signifikant (EGFR: $p = 0,2$; IR: $p = 0,6$; JNK3: $p = 1$).

Tabelle 4-1 Differentielle Expression der GADPH-, EGFR-, JNK3-, IR- und LOXL4-mRNA

Nr.	Lokalisation	Typ	Dignität	Alter/Sex	TNM	GAPDH	EGFR	JNK3	IR	LOXL4
1	Larynx	P	Maligne	81/m	T2N2M0	+++	-	-	+++	-
2	Larynx	P	maligne	81/m	T3N0M0	+++	+++	-	+++	+
3	Larynx	P	maligne	52/m	T4N2M0	+++	+++	-	+++	+++
4	Larynx	P	maligne	81/w	T3N0M0	+++	+++	-	+++	-
5	Larynx	P	maligne	71/m	T3N0M0	++	++	-	+++	-
6	Hypopharynx	P	maligne	74/m	T4N2M0	+++	+	-	+++	+++
7	Hypopharynx	P	maligne	73/m	T4N0M0	+	-	-	+++	+
8	Hypopharynx	P	maligne	65/m	T4N2M1	+	+	-	+++	++
9	Hypopharynx	P	maligne	54/m	T4N3M0	+++	++	-	-	+
10	Hypopharynx	P	maligne	66/w	T4N2M0	++	+++	-	+++	-
11	Hypopharynx	P	maligne	56/m	T4N2M0	++	-	-	++	+++
12	Oropharynx	P	maligne	67/m	T4N2M0	++	+	-	-	+++
13	Oropharynx	P	maligne	66/m	T2N2M0	++	+	-	+	+++
14	Tonsillen ¹	P	maligne	80/w	T2N2M0	+++	+	-	-	-
15	Oropharynx	/	benigne	/	/	++	-	-	+++	-
16	Zungengrund ²	P	maligne	55/m	T3N1M0	++	+	-	+++	+++
17	Oropharynx	P	maligne	65/m	T4N2M0	+	-	-	+++	-
18	Zungengrund ²	P	maligne	62/m	T4N2M0	+	-	-	+++	+++
19	Zungengrund ²	P	maligne	55/m	T3N1M0	+	-	-	++	+++
20	Zungengrund ²	P	maligne	59/m	T4N2M0	+	-	-	++	-
21	Schilddrüse	M	maligne	68/m	TxN2M1	+	++	-	++	+
22	Parotis	/	benigne	/	/	+	+	-	+++	-
23	Parotis	/	benigne	/	/	+	+	-	++	-
24	Zungengrund ²	P	maligne	55/m	T3N1M0	++	+++	-	+++	++
25	Tonsillen ¹	P	maligne	44/w	T2N1M0	+++	+++	-	+++	++
26	Larynx	P	maligne	51/m	T2N0M0	+++	+++	-	+++	++
27	Larynx	P	maligne	58/m	T3N2M0	+++	+++	+	+++	+++
28	Zungengrund ²	P	maligne	66/w	T3N0M0	++	+++	-	+++	+++
29	Hypopharynx	M	maligne	50/m	T2N2M1	+++	+++	-	+++	+++
30	Larynx	P	maligne	56/m	T2N2M0	+++	-	-	+++	-
31	Larynx	P	maligne	64/m	T4N0M0	+++	+++	-	+++	+++
32	Larynx	P	maligne	61/w	T4N1M0	+++	+++	-	+++	+++
33	Hypopharynx	P	maligne	64/m	T4N2M0	+++	+	-	+++	+
34	Larynx	P	maligne	66/m	T4N1M0	+++	-	-	+++	++
35	Oropharynx	P	maligne	56/m	T4N1M0	+++	+++	-	+++	++
36	Larynx	P	maligne	68/m	T3N0M0	+++	+++	-	+++	+++
37	Larynx	P	maligne	77/w	T3N2M0	+++	++	-	+	+++
38	Hypopharynx	P	maligne	45/m	T3N2M0	++	-	-	++	+
39	Hypopharynx	P	maligne	67/m	T4N3M0	+++	+	-	+++	+
40	Larynx	P	maligne	70/m	T3N0M0	++	+++	-	+++	+++
41	Larynx	/	benigne	11/m	/	++	-	-	++	-
42	Larynx	P	maligne	58/m	T3N2M0	+++	+	-	-	+++
43	Hypopharynx	P	maligne	64/m	T2N1M0	++	+	-	-	-
44	Hypopharynx	P	maligne	69/w	T2N0M0	++	+	-	+	-
45	Larynx	P	maligne	73/m	T2N0M0	+++	++	+	-	++
46	Hypopharynx	M	maligne	53/m	TxN2M1	++	-	++	-	-
47	Lymphknoten	M	maligne	49/m	T4N2M0	+++	-	+	+	+
48	Lymphknoten	M	maligne	55/m	T3N2M0	+++	+	-	+	-
49	Lymphknoten	M	maligne	63/m	T3N2M0	+++	++	+	+	+++
50	Lymphknoten	M	maligne	67/m	T4N3M0	+++	++	+++	+	+++
51	Lymphknoten	M	maligne	79/m	T4N2M0	+++	+	-	+++	-
52	Lymphknoten	M	maligne	53/w	TxN2M0	+++	-	++	-	++
53	Lymphknoten	M	maligne	80/w	T3N2M0	+	+	-	-	-
54	Lymphknoten	M	maligne	46/m	T4N2M0	+++	+++	-	++	+++
55	Tonsillen ¹	P	maligne	46/w	T3N3M0	+++	+++	-	++	+
56	Tonsillen ¹	P	maligne	51/w	T3N2M0	+++	+	-	++	+++
57	Hypopharynx	M	maligne	90/w	TxN3M1	+++	+++	-	++	+++
58	Lymphknoten	M	maligne	45/m	T3N2M0	+++	+	-	-	+++
59	Parotis ³	M	maligne	68/m	T1N1M1	+++	+++	-	+++	-
60	NNH ³	P	maligne	82/w	T4N0M0	++	+++	-	+++	+++
61	NNH ³	P	maligne	65/w	T4N0M0	++	+	-	-	-
62	Zungengrund ²	P	maligne	55/W	T3N0M0	+++	+++	-	-	-
63	SHZ	/	benigne	66/w	/	++	-	++	++	-
64	SHZ	/	benigne	36/w	/	++	-	++	++	-
65	SHZ	/	benigne	42/m	/	+++	-	++	++	-
66	SHZ	/	benigne	59/m	/	++	-	++	-	+
67	SHZ	/	benigne	57/m	/	++	++	-	+	-
68	SHZ	/	benigne	78/m	/	++	-	-	-	-
69	SHZ	/	benigne	73/m	/	++	++	+	-	-

P = Primärtumor; M = Metastase; (-) keine Expression; (+) schwache Expression; (++) mittlere Expression; (+++) starke Expression, (/) nicht zutreffend. NNH = Nasennebenhöhle; SHZ = Schleimhautzellen. BEMERKUNGEN: Nr. 15, 41: Biopsate von einer Papillomatose. Nr. 22, 23: Biopsate von einem Parotisadenom. Nr. 21, 46, 52, 57: Metastase bei Cancer of unknown primary (CUP)-Syndrom. Nr. 29, 49- 51, 53, 54, 58: Primärtumor im Hypopharynx. Nr. 47- 48: Primärtumor im Larynx. Nr. 59: Primarius im Nasopharynx. ^{1,2}Tumoren des Zungengrundes und der Tonsillen zählen zu Oropharynxkarzinomen und wurden hier aufgrund der großen Probenanzahl gesondert aufgeführt. ³genaue Lokalisation: Sinus maxillaris

4.2 Expression einzelner Gene im Vergleich zueinander

Folgende sechs Genkombinationen ergeben sich: LOXL4 und EGFR; LOXL4 und IR; LOXL4 und JNK3; EGFR und IR; EGFR und JNK3 sowie IR und JNK3. Sie wurden vergleichend analysiert.

Bei 35 von 58 (60 %) Tumorproben wurden gleichzeitig das LOXL4- und IR-Gen exprimiert. Bei 11 Proben war die alleinige Expression des IR- und in 6 Proben nur die des LOXL4-Gens nachweisbar. In 6 Proben zeigte sich weder IR- noch LOXL4-Expression. Die gleichzeitige Expression beider Gene in den Tumorbiopsaten war nicht signifikant ($p = 0,2$).

Ebenfalls bei 60 % aller Tumorbiopsate konnte die simultane Expression des EGFR- und des IR-Gens nachgewiesen werden. In der Gruppe der 11 benignen Proben war die gleichzeitige Expression beider Gene mit 27 % signifikant geringer verzeichnet als bei den malignen Proben ($p = 0,05$).

Es ergab sich eine negative Korrelation von der Expression des JNK3- und der des IR-Gens. In 42 (72 %) Tumorproben war nur das IR-Gen exprimiert, wenn auch ohne statistische Signifikanz ($p = 0,1$), und 45 % der benignen Proben exprimierten allein das IR-Gen ($p = 0,5$). Der Vergleich von der gleichzeitigen Expression des IR- und des JNK3-Gens bei malignen und benignen Proben zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,2$).

Die drei verbliebenen Genkombinationen wiesen weder bei malignen noch benignen Tumoren ausgeprägte Expressionsunterschiede auf. Die Höhe der LOXL4- und EGFR-Genexpression betrug 57 % bei den Tumorproben und 55 % bei den benignen Proben ($p = 1,0$). LOXL4 und JNK3 wurden in 10 % der malignen Proben und in 9 % der benignen Proben gleichzeitig exprimiert ($p = 1,0$). Das EGFR- und das JNK3-Gen wurden in den malignen nur zu 7 % und in den benignen Proben zu 9 % exprimiert ($p = 1,0$).

4.3 Analyse der Genexpression bei unterschiedlichen TNM-Stadien

Die Expression der vier Gene wurde in Hinblick auf das TNM-Stadium untersucht. Eine genaue Differenzierung der TNM-Klassifikation für die einzelnen hier untersuchten Tumoren ist den Tabellen 8-1 bis 8-8 im Anhang zu entnehmen.

4.3.1 Expression der Gene in Abhängigkeit von der Ausdehnung des Primärtumors (T1-T4 ohne Tx)

Um Aussagen über die Expression der untersuchten Gene in Bezug auf die Ausdehnung des Primärtumors zu gewinnen, wurden die Ergebnisse nach der Zugehörigkeit zum T-Stadium nach zunehmender Ausdehnung von T1 bis T4 aufgeschlüsselt.

Einen Sonderfall stellt die Kategorie Tx beim „Cancer of Unknown Primary“-Syndrom (CUP-Syndrom) dar. Bei dieser Erkrankung ist die genaue Lokalisation und damit auch die Ausdehnung des Primärtumors unbekannt, die Erkrankung tritt durch Metastasen in Erscheinung. Die 4 Proben, die zu dieser Kategorie gehören, wurden daher nicht in diesen Teil der Auswertung miteinbezogen.

Die Verteilung der T-Stadien stellte sich wie folgt dar: T1 = 2 %, T2 = 17 %, T3 = 35 %, T4 = 40 % und Tx = 7 %. Die Expression der vier Gene in der Gruppe T4 (n = 23) wurde mit der der Gruppen T1-T3 (n = 31) verglichen (siehe Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2 Differentielle Genexpression in Abhängigkeit vom T-Stadium

		EGFR	JNK3	IR	LOXL4
T1-T3 (n = 31)	Anzahl der positiven Proben	27	3	24	20
	Anteil an der Gesamtzahl	87 %	10 %	77 %	65 %
T4 (n = 23)	Anzahl der positiven Proben	16	2	20	18
	Anteil an der Gesamtzahl	70 %	9 %	87 %	78 %
p-Wert		0,2	1	0,5	0,4

Wie aus der Tabelle ersichtlich wird, konnte für kein Gen ein statistisch signifikanter Expressionsunterschied nachgewiesen werden.

4.3.2 Genexpression bei regionärer Lymphknotenmetastasierung (N0-N3)

Um zu erfahren, wie sich die differentielle Expression der vier untersuchten Gene bei den verschiedenen Stufen der regionären Lymphknotenmetastasierung verhält, wurden die malignen Proben aus Tabelle 4-1 in Bezug auf ihr N-Stadium analysiert. Die Stadieneinteilung von N0 bis N3 ist der Tabelle 8-7 im Anhang zu entnehmen. Ausgewertet wurden in diesem Abschnitt nur jene 52 malignen Proben, die keine Fernmetastasierung in andere Organe aufweisen.

Die Verteilung der 52 malignen Proben auf die N-Stadien ist in Tabelle 4-3 dargestellt.

Tabelle 4-3 Verteilung der malignen Proben auf die N-Stadien

	N0	N1	N2	N3
Anzahl der Biopsate	14	8	26	4
Anteil am Kollektiv	27 %	15 %	50 %	8 %

Insgesamt zeigten die 4 untersuchten Gene bei allen Stadien des Lymphknotenbefalls eine Überexpression, jedoch ohne dass ein Stadium ein charakteristisches Expressionsmuster aufwies. Es konnte für keines der untersuchten Gene ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Tabelle 4-4).

Das LOXL4-Gen zeigte eine mit dem N-Stadium steigende Expressionshöhe, wobei die Proben im N2-Stadium weniger LOXL4 exprimierten als diejenigen im Stadium N1. Im Stadium N3 waren alle Tumorproben LOXL4-positiv (N0: 64 %; N1: 88 %; N2: 65 %; N3: 100 %).

Beim EGFR-Gen verzeichnete sich eine kontinuierliche Abnahme der Expression von N0 bis N2 (N0: 93 %; N1: 75 %; N2: 65 %). Allerdings exprimierten alle 4 N3-Proben EGFR. Auch LOXL4 wurde zu 100% in den N3-Proben exprimiert.

Für das IR-Gen ergab sich eine weitestgehende Konstanz der Expression in den verschiedenen N-Stadien (N0: 79 %; N1: 88 %; N2: 77 %; N3: 75 %).

Die JNK3-Genexpression war auf die einzelnen Gruppen statistisch zufällig verteilt (N0: 7 %; N1: 0 %; N2: 15 %; N3: 25 %).

Tabelle 4-4 Differentielle Genexpression in Abhängigkeit vom N-Stadium

		EGFR	JNK3	IR	LOXL4
Genexpression bei Proben in Stadium N0 (n = 14)	Anzahl	13	1	11	9
	Anteil	93 %	7 %	79 %	64 %
Genexpression bei Proben in Stadium N1 – N3 (n = 38)	Anzahl	27	5	30	28
	Anteil	71 %	13 %	79 %	74 %
p-Wert		0,1	1	1	0,5

4.3.3 Differentielle Expression bei Fernmetastasierung (M0 vs. M1)

Es wurde die Expression der einzelnen Gene bei Tumoren mit Fernmetastasierung (M1, n = 6) mit der bei Tumoren ohne Fernmetastasierung (M0, n = 52) verglichen. Auch hierbei konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (EGFR: $p = 1$; JNK3: $p = 0,6$; IR: $p = 0,6$; LOXL4: $p = 1$).

4.4 Vergleich der Genexpression bei Primärtumoren und Metastasen

Die insgesamt 58 untersuchten malignen Proben setzten sich aus 44 Primärtumoren und 14 Metastasen zusammen. Bei den Metastasen handelte es sich um 8 regionäre Lymphknotenmetastasen und 6 Fernmetastasen. Es wurde untersucht, ob sich die Expression der vier Gene bei Primärtumoren und Metastasen unterschied.

Das EGFR-, das JNK3-, das IR-Gen und das LOXL4-Gen wurden auch in den Metastasen deutlich überexprimiert (EGFR: 78 %; JNK3: 36%; IR: 71 %; LOXL4: 64 %).

Die Expression des EGFR-Gens bei Primärtumoren und Metastasen war weitestgehend identisch (77 % bei Primärtumoren, 79 % bei Metastasen). LOXL4 zeigte bei den Metastasen einen leichten Expressionsabfall (73 % zu 64 %). Gleiches ließ sich für die Expression des IR-Gens feststellen (82 % zu 71 %).

Für das JNK3-Gen war hingegen ein deutlich signifikanter Expressionsunterschied zu verzeichnen: Es exprimierten nur 2 von 44 (5 %) Primärtumoren JNK3, aber 5 von 14 (36 %) Metastasen ($p = 0,01$).

Auch wurde die Genexpression bei regionären Lymphknotenmetastasen mit der bei Fernmetastasen verglichen. Die größte Diskrepanz zeigte erneut die JNK3-Expression mit 50 % positiven Lymphknotenmetastasen und 17 % positiven Fernmetastasen, jedoch ohne statistische Signifikanz ($p = 0,3$). Für die anderen untersuchten Gene konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden (EGFR: $p = 1$; IR: $p = 1$; LOXL4: $p = 0,6$).

4.5 Beziehung der Genexpression zu Lokalisation, Alter und Geschlecht

Die Expressionshäufigkeit der einzelnen Gene wurde in Abhängigkeit von der Lokalisation des Primärtumors untersucht. Tabelle 4-5 gibt die verschiedenen Lokalisationen der untersuchten Tumoren und ihren prozentualen Anteil am Kollektiv wieder. In Tabelle 4-6 ist die Expressionshäufigkeit der Gene in den jeweiligen Lokalisationen aufgeführt.

Tabelle 4-5 Verteilung der Primärtumoren auf die Lokalisationen

Lokalisation	Anzahl	Verteilung
Larynx	16	36 %
Zungengrund ¹	7	16 %
Tonsillen ¹	4	9 %
Oropharynx ²	4	9 %
Hypopharynx	11	25 %
Nasennebenhöhlen ³	2	5 %

¹Zungengrund- und Tonsillenkarcinome zählen formal zu den Oropharynxkarzinomen und wurden aufgrund der größeren Probenanzahl innerhalb der Oropharynxkarzinomen getrennt betrachtet.

²Ausgenommen Karzinome an Zungengrund und Tonsillen. ³Genaue Lokalisation: Sinus maxillaris

Tabelle 4-6 Genexpression bei Primärtumoren, nach Lokalisationen aufgeschlüsselt

Lokalisation		EGFR	JNK3	IR	LOXL4
Larynx	Anzahl	13	2	14	12
	Anteil	81 %	13 %	88 %	75 %
Zungengrund ¹	Anzahl	4	0	6	5
	Anteil	57 %	0 %	86 %	71 %
Tonsillen ¹	Anzahl	4	0	3	3
	Anteil	100 %	0 %	75 %	75 %
Oropharynx ²	Anzahl	3	0	3	3
	Anteil	75 %	0 %	75 %	75 %
Hypopharynx	Anzahl	8	0	9	8
	Anteil	73 %	0 %	82 %	73 %
Nasennebenhöhlen	Anzahl	2	0	1	1
	Anteil	100 %	0 %	50 %	50 %

^{1,2}s. Tabelle 4-5

Aus diesen Verteilungen ist ersichtlich, dass drei von den vier untersuchten Genen (EGFR, IR, LOXL4) unabhängig von der Lokalisation des Primärtumors exprimiert werden. JNK3 wird nur bei Primärtumoren exprimiert, die im Larynx lokalisiert sind.

Bei der Analyse der Altersverteilung ließ sich feststellen, dass in den Tumoren jüngerer Probanden (44 - 64 Jahre; $n = 30$) das LOXL4-Gen in 24 Fällen (80 %) exprimiert wurde und in denen der älteren Probanden (65 - 90 Jahre; $n = 28$) in 17 Fällen (61 %, $p = 0,2$). Das JNK3-Gen wurde in der Gruppe der jüngeren Probanden ebenfalls häufiger exprimiert (17 %) im Vergleich zur Gruppe der Älteren (7 %, $p = 0,4$). Ein umgekehrter Verlauf war bei der IR- und EGFR-Genexpression zu verzeichnen. Bei dem IR-Gen zeigte sich eine Häufung der positiven Fälle in der Gruppe der 65-90jährigen (82 %) im Vergleich zu den jüngeren Probanden (77 %, $p = 0,7$) und bei dem EGFR-Gen 86 % in der Gruppe der 65-90jährigen im Vergleich zur jüngeren Gruppe (70 %, $p = 0,2$).

In Bezug auf die Geschlechtsverteilung bei den 58 malignen Proben wurde eine deutlich häufigere EGFR-Expression bei den Frauen ermittelt (94 % zu 71 %, $p = 0,08$). Die Expression der drei weiteren Gene zeigte ebenfalls Unterschiede bei beiden Geschlechtern, jedoch ohne statistische Signifikanz. Bei ihnen konnte eine vermehrte Expression bei Männern nachgewiesen werden (JNK3: Männer 15 %, Frauen 6 %, $p = 0,6$; IR: Männer 83 %, Frauen 71 %, $p = 0,3$; LOXL4: Männer 76 %, Frauen 59 %, $p = 0,2$).

5 Diskussion

Die im Bereich der Krebsforschung am häufigsten bearbeitete Aufgabenstellung bei der Analyse von Genexpressionsprofilen ist die Detektion von Genen mit differentieller Expression bei verschiedenen Phänotypen. Bislang wurden bei Tumorpatienten aus dem HNO-Bereich nur wenige mit Kopf-Hals-Karzinomen assoziierte Gene untersucht. Diese Arbeit liefert neue Ergebnisse zur simultanen Identifizierung von vier differentiell exprimierten Genen (EGFR, JNK3, IR und LOXL4) in 58 Kopf-Hals-Karzinomen und in gesunden Kontrollpräparaten, die mit Hilfe der Northern-Hybridisierungstechnik gewonnen wurden. Wie in den nächsten Abschnitten aufgeführt, werden verschiedene Aspekte vergleichend erläutert, die sowohl die Physiologie und tumorbiologische Bedeutung dieser vier Gene bei Kopf-Hals-Karzinomen als auch deren Bezug zu wichtigen klinisch-histopathologischen Parametern betreffen.

5.1 EGFR

5.1.1 Expression von EGFR

EGFR und seine Liganden spielen eine Schlüsselrolle in der Karzinogenese durch Beeinflussung der Zellproliferation, der Mechanismen der Apoptose, Angiogenese und Metastasenbildung. Die Überexpression von EGFR konnte bei verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden (Rossi et al., 2008; Lu et al., 2001; Lee et al., 1997; Christensen et al., 1993).

Bei Kopf-Hals-Karzinomen konnten Christiansen und Mitarbeiter keine signifikante Korrelation von EGFR-Expression zum klinischen Verlauf feststellen, so dass der Einsatz als Prognosefaktor nur begrenzt möglich erscheint (Christensen et al., 1995). Diese Ergebnisse finden Anlehnung an Untersuchungen zur Überexpression von EGFR bei Larynxkarzinomen (Lee et al., 1996). Die Bedeutung von EGFR scheint, so schlussfolgern die Autoren, möglicherweise in der Entstehung, nicht aber in der

Progression von Plattenepithelkarzinomen zu liegen. Jedoch ist anzunehmen, dass durch Entwicklung von verschiedenen EGFR-Hemmstoffen in den letzten Jahren die Bedeutung von EGFR in der zukünftigen Therapie von Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches weiter steigen wird (Christensen et al., 1995; Ahmed und Cohen, 2007).

Andererseits unterstrichen Rubin Grandis und Mitarbeiter die Bedeutung von EGFR und seinem Liganden TGF- α bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich, da sie beide als signifikante prädiktive Marker für das rezidivfreie und das krankheitsspezifische Überleben identifizieren konnten. Ihre Bestimmung könnte dazu beitragen, Hochrisikogruppen zu identifizieren, die einer besonderen Nachsorge bedürfen (Rubin Grandis et al., 1998). Im allgemeinen wird mittlerweile eine Assoziation von erhöhter EGFR-Expression und der Ausdehnung der Tumorerkrankung sowie der Überlebensrate gesehen (Herbst und Hong, 2002).

Die Analysenergebnisse der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patientenproben zeigten ebenfalls einen signifikanten Anstieg der Expression von EGFR bei Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. Hier fiel besonders auf, dass alle Karzinome mit ausgedehnter Lymphknotenmetastasierung (N3) EGFR-positiv waren. Dies könnte ebenfalls für die Bedeutung von EGFR als prädiktiver Marker sprechen. Hinsichtlich der Fernmetastasierung und Größe des Primarius gab es bei dem hier untersuchten Kollektiv keine Expressionsunterschiede. EGFR wurde allerdings deutlich häufiger bei weiblichen Patienten unabhängig von ihrem Krankheitsprogress exprimiert ($p = 0,08$). Dies wurde bislang in der Literatur noch nicht beschrieben.

Die routinemäßige Bestimmung von EGFR birgt allerdings Schwierigkeiten, da die Expression großen interindividuellen Schwankungen unterliegt. Gesunde Proben und Tumorbiosate vom selben Patienten zeigen allerdings einen deutlichen Expressionsunterschied von EGFR von 83 % zugunsten der Karzinome (Christensen et al., 1995).

Die Expression von EGFR im Malignom sollte daher mit der Expression in der Mukosa desselben Patienten verglichen werden.

Auch wenn die prognostische Wertigkeit der EGFR-Expression kontrovers diskutiert wird, besteht doch allgemeine Übereinstimmung in Bezug auf die Überexpression von EGFR bei Karzinomen; und diese Überexpression stellt einen neuen Therapieangriffspunkt durch selektive Inhibierung der EGFR-Tyrosinkinase dar.

5.1.2 EGFR-Hemmstoffe in der Karzinomtherapie

Nachdem die Amplifikation des EGFR-Genes und eine Mutation der Domäne der EGFR-Tyrosinkinase bei vielen menschlichen Karzinomen entdeckt wurde, fanden Normanno und Mitarbeiter heraus, dass beide genetischen Veränderungen mit einer hohen Ansprechrate auf anti-EGFR-Substrate korrelieren (Normanno et al., 2006). Eine Hemmung des EGF-Rezeptors bei Kopf-Hals-Karzinomen bewirkt eine Wachstumsverzögerung des Tumors, nicht aber der gesunden Mukosa (Rubin Grandis et al., 1997). Die Modulation des EGFR-Rezeptors ist daher Gegenstand der aktuellen onkologischen Forschung, wird aber auch bereits in der klinischen Therapie eingesetzt. Therapieansätze sind Antikörper gegen die Liganden-bindende Domänen des Rezeptors und Hemmstoffe der EGFR-Tyrosinkinase (Bianco et al., 2007).

Ein Antikörper gegen den EGFR-Rezeptor bei Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich ist Cetuximab, ein chimärer monoklonaler Maus/Human-Antikörper. Er hemmt den Rezeptor kompetitiv, indem er die extrazelluläre Andockstelle für EGF und TGF- α blockiert (Harding und Burtneß, 2005). Dadurch wird zum einen der nachfolgende Signalweg unterbrochen, was zu vermehrter Apoptose, Inhibition der Zellproliferation und reduzierter Angiogenese, Invasivität und zur Metastasenbildung führt. Zum anderen wird der Antikörper-Rezeptor-Komplex ins Zellinnere transportiert, wodurch die Expression des Rezeptors herunterreguliert wird (Harding und Burtneß, 2005).

Eingesetzt in Kombination mit Radiatio und Chemotherapie, konnten vielversprechende klinische Erfolge in Phase-II/III-Studien gezeigt werden (Harding und Burtneß, 2005). Cetuximab ist in der EU für die gleichzeitige Behandlung mit Radiatio für Kopf-Hals-Karzinome zugelassen, in einigen Ländern auch als Monotherapie nach erfolgloser Chemotherapie. Auch bei Kolonkarzinomen wird Cetuximab eingesetzt, wie auch Panitumumab, ein weiterer EGFR-Antikörper (Lacouture und Melosky, 2007).

Als häufigste Nebenwirkungen wurden allergische Reaktionen und akneiforme Hautveränderungen beschrieben (Herbst und Hong, 2002), wobei letztere mit erhöhter Erfolgsquote der Therapie assoziiert sind (Burtneß, 2005).

Andere Substanzen zur Blockade des EGF-Rezeptors inhibieren dessen Signalfunktion, vermittelt durch die EGFR-Tyrosinkinase. Dieses Enzym ist entscheidend an der Weiterleitung des Wachstumssignals ins Innere der Zelle

beteiligt. Bei Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich, Mamma- und Adenokarzinomen der Lunge zeigten EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren Therapieerfolge (Ahmed und Cohen, 2007; Hann und Brahmer, 2007). Im klinischen Alltag werden Gefitinib und Erlotinib zur Behandlung von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen und Trastuzumab zur Behandlung des Mammakarzinomes eingesetzt (Ahmed und Cohen, 2007).

5.2 JNK3

5.2.1 JNK3 in der Gruppe der mitogen-aktivierten Proteinkinasen

Beim zweiten in dieser Arbeit untersuchten Gen handelt es sich um JNK3. Sie gehört zur Gruppe der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs), einer Gruppe von Signaltransduktionsmolekülen, die wichtige Funktionen bei der intrazellulären Weiterleitung von äußeren Signalen besitzen. Zu ihnen zählen außer JNK3 noch die extracellular-signal regulated kinase (ERK) 1 und ERK2, p38 MAPK, JNK1 und JNK2.

Während die Extrazellulär signalregulierten Kinasen 1 und 2 (ERK 1/2) Zellwachstum und Differenzierung regulieren, werden p38 MAPK und die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK1, JNK2 und JNK3) unter dem Namen „Stress activated protein kinases“ (SAPKs) zusammengefasst, da sie hauptsächlich eine Rolle bei Stressantworten wie Entzündungen und Apoptose spielen (Kyriakis und Avruch, 1996). JNK1 und JNK2 sind allerdings auch an der Regulation von Proliferation und embryonaler Gewebsentwicklung beteiligt (Ip und Davis, 1998; Chen und Tan, 2000). Die JNK-Kaskaden wurden mit vielen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht, dazu zählen maligne Neoplasien, Diabetes mellitus, Apoplex, Koronare Herzkrankheit, Morbus Parkinson, Alzheimer-Demenz und Entzündungen.

JNK3 wird hauptsächlich im Gehirn produziert. Unter den JNKs wird am ehesten JNK3 die Funktion eines Tumorsuppressorgenes zugeschrieben, da die anderen beiden Isoformen JNK1 und 2 ubiquitär vorkommen (Kennedy und Davis, 2003). JNK3 scheint eine wichtige Rolle in der Apoptose zu spielen. Es konnte anhand von

Knock-out-Mäusen eine Resistenz der Nervenzellen gegenüber Zelltodsignalen festgestellt werden, wenn JNK3 ausgeschaltet wurde (Hommes et al., 2003). Auch für die Apoptose von Prostatakarzinomzellen nach der Chemotherapie konnte die zentrale Rolle von JNK gezeigt werden (Curtin und Cotter, 2002). Mansouri und Mitarbeiter erhoben ähnliche Befunde an Ovarialkarzinomen (Mansouri et al., 2003). Sie konnten eine erhöhte Resistenz gegen Cisplatin in Ovarialkarzinomzellen nachweisen, die durch einen Defekt der JNK-Signalkaskade zu erklären war. Eine Wachstumshemmung wurde bei Kolonkarzinomen nach Gabe von Stickoxid-Aspirin (Acetylsalicylsäure mit angehängter –ONO(2)-Gruppe) festgestellt, die mit der Aktivierung von JNK und p38 assoziiert war (Hundley und Rigas, 2005).

Es konnten Mutationen des JNK3-Genes und damit Funktionsverlust der JNK3 in Hirntumoren nachgewiesen werden (Yoshida et al., 2001), was die spezifische tumorsuppressive Funktion dieses Enzyms unterstreicht (Yoshida et al., 2001).

Umgekehrt sind die anderen beiden Isoformen JNK1 und 2 möglicherweise in die Karzinogenese involviert (Kennedy und Davis, 2003). Für JNK2 wurde die Aktivierung des bei 80 % aller Karzinome vorkommenden Onkogenes *ras* nachgewiesen (Nielsen et al., 2007) und auch scheint ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung des JNK1/2-Signalweges und der Pathogenese von Osteosarkomen zu bestehen (Papachristou et al., 2003).

Aktiviert werden JNKs von den unmittelbar stromaufwärts gelegenen MAPKK 4 und 7. Während der Kaskade zur Aktivierung von MAPKK 4 Stressreize der Umgebung zu Grunde liegen, wird die Signalkette vor MAPKK 7 durch Zytokine angeregt (Hundley und Rigas, 2005). Zu den aktivierenden Zytokinen zählen der apoptoseauslösende Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), der dem TNF nahestehende Fas-Ligand und Interleukin 1 (Sluss et al., 1994; Gupta et al., 1996; Goillot et al., 1997). Auch zytoplasmatische Organellen wie Mitglieder der pro- oder antiapoptotisch wirkenden *bcl-2* Proteinfamilie, Proteine des Zytoskelettes, andere Kinasen, und Glucokortikoidrezeptoren sind Substrate der JNKs (Mielke und Herdegen, 2000).

Es sei jedoch erwähnt, dass JNKs nicht nur aktiviert, sondern auch durch MAP-Kinase-Phosphatase MKP7, heat shock protein 72, Evi1-Onkoprotein und Stickoxid gehemmt werden können (Weston und Davis, 2002; Lander et al., 1996).

5.2.2 Die JNK-Kaskaden und ihre Aktivatoren in der onkologischen Forschung

Einzelne Enzyme der MAPK-Signalkaskaden und ihre stromaufwärts gelegenen Aktivatorenzyme MAPKK 4 und 7 könnten aufgrund ihrer Rolle in Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose einen interessanten Angriffspunkt in der Tumorthherapie bieten. Als erster oraler Hemmstoff der Raf-Serin/Threoninkinase, einem Protein des ERK-Signaltransduktionsweges, wurde Sorafenib für die Therapie des Nierenzellkarzinoms eingeführt (Gollob et al., 2006). Sebolt-Leopold und Mitarbeiter untersuchten einen MAPKK-Hemmstoff für Kolonkarzinome an Mäusen, der bei 80 % der humanen und muralen Kolonkarzinome eine Wachstumsinhibition zeigte (Sebolt-Leopold et al., 1999).

Bisher liegen nur wenige Berichte über MAPKs im Zusammenhang mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches vor. Die Arbeitsgruppe von Masuda befasste sich mit der durch Vitamin A (All-trans-Retinyl-Palmitat) und 5-Fluorouracil induzierten Apoptose bei zwei Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien und fand, dass diese JNK1-vermittelt ist (Masuda et al., 2002). Auch JNK2, p38 und ERK scheinen eine Rolle bei der Apoptosevermittlung durch Vitamin A-Säuren-Therapie bei Kopf-Hals-Karzinomen zu spielen (Kim et al., 2006). Für p38 wurde weiterhin eine zentrale Rolle in der Cisplatin-induzierten Apoptose beschrieben (Losa et al., 2003). Insgesamt betrachtet mehrten sich die Befunde dafür, dass durch gezielte Beeinflussung von MAPK-Signalwegen die Effektivität von zytotoxischen Chemotherapeutika gesteigert werden kann.

Jedoch sei darauf hingewiesen, dass die Expression von JNK1 und 2 nicht nur bei der Apoptoseeinleitung durch Chemotherapie, sondern auch bei nichtbehandelten Kopf-Hals-Karzinomen deutlich erhöht ist und scheint damit widersprüchlicherweise auch einen Progressionsfaktor darzustellen (Gross et al., 2007). Anhand dieser teilweise konträren Beobachtungen wird der funktionelle Dualismus des JNK-Signaltransduktionsweges deutlich. Die JNKs scheinen sowohl als Tumorsuppressoren wie auch als Tumorpromotoren zu agieren.

Betrachtet man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, so wird evident, dass die JNK3-mRNA-Expression in den untersuchten Tumorproben supprimiert ist, während in den benignen Schleimhautproben eine deutliche Expression nachweisbar ist ($p = 0,02$). Demnach würde diese Feststellung die These unterstützen, dass JNK3 eher als Tumorsuppressor fungiert. Interessanterweise wurde in den Biopsaten von Lymphknoten- und Fernmetastasen wieder eine höhere Expression von JNK3 gefunden als in den Primärtumoren ($p = 0,01$). Eine Feststellung dieser Art wurde in der Literatur bislang noch nicht beschreiben. Ob dies als Zeichen einer möglichen Entdifferenzierung der Metastasen gewertet werden kann, bleibt Spekulation.

Auch Kennedy und Davis beschrieben sowohl eine suppressive Wirkung von JNK auf die Entwicklung von Hirntumoren als auch die Förderung der Entstehung von B-Zell-Lymphomen, und kamen zur Schlussfolgerung, dass die konträre Auswirkung in den verschiedenen Zellen von den JNK vermittelten Signaltransduktionskaskaden abhängig und wahrscheinlich nicht immer sicher vorhersagbar ist (Kennedy und Davis, 2003).

Es ist weiterführende intensive Forschung nach den Funktionsmechanismen der einzelnen JNKs notwendig, um die Ausschaltung von spezifischen pathologischen Funktionen der JNKs zu ermöglichen oder ihre spezifischen physiologischen Funktionen zu erhalten. Insbesondere sollte dabei auf eine genaue Differenzierung zwischen JNK1/2 einerseits und JNK3 andererseits geachtet werden.

5.3 IR

5.3.1 IR und IGF1R

Das dritte untersuchte Gen kodiert für den IR, der zu den Wachstumsfaktoren zählt. Für ihn wurden zum einen vorrangig metabolische Funktionen im Glukosestoffwechsel, aber auch mitogene Funktionen bei Differenzierung und Zellwachstum beschrieben. Letzere ist vom quantitativen Verhältnis von IR zum

insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) abhängig, der ebenfalls ein Wachstumsfaktor-Rezeptor ist. Die Liganden insulin-like growth factor (IGF) 1 und 2 binden vorrangig an den IGF1R und Insulin an den IR, die Bindung kann aber auch – mit geringerer Affinität – am jeweils anderen Rezeptor erfolgen.

In malignen Zellen können IGF1 und 2 gebildet werden und auto- und parakrine Wirkungen entfalten (Sciacca et al., 1999; Pandini et al., 1999).

Für die Isoform A des Insulinrezeptors (IR-A) konnte festgestellt werden, dass sie den Wachstumsfaktor IGF2 mit ähnlich hoher Affinität wie für Insulin zu binden vermag. Die Aktivierung des IR-A durch IGF2 führt nicht zu den bekannten metabolischen, sondern zu proliferativen und antiapoptotischen Effekten. Differenzierung und Migration werden auch durch IR-A reguliert (Haluska et al., 2006). Physiologischerweise wird der IR-A in erhöhtem Maße in fetalen Fibroblasten, Muskel-, Leber- und Nierenzellen exprimiert, jedoch findet sich ebenso eine erhöhte IRA/IRB-Ratio bei verschiedenen Malignomen wie Mamma-, Schilddrüsen-, Nierenzell-, Prostata- und Kolonkarzinomen (Frasca et al., 1999; Vella et al., 2001; Belfiore, 2007). Außer der erhöhten Expression von IR-A konnte in Tumorzellen auch ein erhöhtes Vorkommen von IGF2 festgestellt werden. Beides zusammen führt zu einer autokriner Stimulation, durch die die Karzinomzelle ihr eigenes Wachstum fördert. Dies konnte insbesondere für schlecht differenzierte Thyreoidkarzinome nachgewiesen werden (Vella et al., 2002).

Über die Expression des IR bei Kopf-Hals-Karzinomen existieren nur wenige Daten, mehr aber für den verwandten IGF1R (Slomiany et al., 2007). Die Expression des IGF1R ist deutlich erhöht bei vielen Karzinomen wie denen von Mamma, Kolon, Prostata sowie beim Malignen Melanom; er scheint die Apoptose zu verhindern (Zhang und Yee, 2004; Prisco et al., 1997). Auch Hybridrezeptoren, die vermutlich durch zufällige Montage von je einer $\alpha\beta$ -Einheit von IR und IGF1R entstehen, kommen vermehrt vor, insbesondere solche, die zur Hälfte aus IR-A bestehen. Auch diese sind in der Lage, entweder Insulin, IGF1 oder IGF2 stark zu binden. Die drei Liganden können Proliferation und Migration anregen und antiapoptotisch wirken (Frasca et al., 1999). Für Mammakarzinome konnte gezeigt werden, dass die Expression des Hybridrezeptors direkt von der Expression des IR abhängig war (Pandini et al., 1999).

Auto- und parakrine Stimulation durch IGF2 kann die Wirkung noch verstärken (Sciacca et al., 1999). Auch IGF1 wird von einigen Tumorzellen, beispielsweise den Stromazellen des Mammakarzinoms, gebildet und wirkt so ebenfalls direkt proliferativ auf die Nachbarzellen (Pandini et al., 1999).

Ebenfalls eine Rolle, wenn auch eine kontrovers diskutierte, scheinen die IGF-spezifischen bindenden Proteine (IGF-BPs) zu spielen. Für IGF-BP3 sind sowohl tumorsuppressive, tumorsupportive als auch keinerlei Wirkung auf Tumorwachstum beschrieben (Wu et al., 2004).

5.3.2 Das Insulin- und IGF-System bei Kopf-Hals-Karzinomen

Die im Rahmen dieser Dissertation untersuchte Expression des IR bei benignen und malignen Biopsaten zeigten keinen relevanten Unterschied (72 % positive benigne Proben; 79 % positive maligne Proben, $p = 0,7$). Interessant ist, dass sich bei diesen untersuchten Biopsaten eine signifikant hohe gleichzeitige Expression von IR und LOXL4 ($p = 0,0002$) und eine hohe, jedoch nicht signifikante Korrelation der Expression von IR und EGFR zeigte ($p = 0,7$).

Diese kombinierte differentielle Expression wurde bislang nicht in der Literatur beschrieben. Im Allgemeinen ist eine erhöhte Expression des IR-Genes bei Kopf-Hals-Karzinomen anhand vorliegender Literatur schlüssig.

Der IR scheint durch seine Aktivierung mit IGF1 die Expression von vascular endothelial growth factor (VEGF), ein weiterer für die Metastasierung wichtiger Wachstumsfaktor, zu regulieren (Slomiany et al., 2006). Es wird auch eine Koexpression von EGFR und IGF1R festgestellt, die Slomiany und Mitarbeiter als mögliches therapeutisches Angriffsziel werten (Slomiany et al., 2007). EGFR und IGF1R bilden bei Kopf-Hals-Karzinomen Heterodimere. Eine simultane Hemmung des Heterodimärs durch die Antikörper Cetuximab und IMC-A12 führte sowohl *in vitro* als auch am Mausmodell zur signifikanten Tumordinhibition, die deutlicher ausfiel als die einzelne Anwendung beider Antikörper (Barnes et al., 2007).

Für einige der IGF-BPs, die IGF an den IGF-Rezeptor überführen, konnte ebenfalls eine Wachstumssuppression von Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich festgestellt

werden. Umgekehrt war eine verminderte Expression von IGF-BP5 mit einem erhöhten Proliferationspotential und Metastasierungsrisiko assoziiert (Hung et al., 2008). Interessanterweise wirkte selbst eine mutierte Version von IGF-BP5 mit zerstörter IGF-Bindungsstelle als tumorsuppressiv. Von den Autoren wird daher eine IGF-unabhängige Tumorsuppression postuliert. Auch für IGF-BP3 wurde eine antimetastatische Wirkung festgestellt. Dies macht man sich bereits therapeutisch zunutze: Kürzlich fand man heraus, dass der Farnesyl-Transferase-Inhibitor Lonafarnib, dessen Wirksamkeit auf Kopf-Hals-Tumoren zwar bewiesen, der Mechanismus zunächst jedoch unklar war, die Sekretion von IGF-BP3 fördert (Oh et al., 2006, B). Lonafarnib wird in verschiedenen klinischen Studien eingesetzt (Morgillo und Lee, 2006).

Abgesehen von Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich konnte eine antimetastatische Wirkung vor allem für IGF-BP3 auch für nicht-kleinzellige Lungen-, Magen- und Mammakarzinome nachgewiesen werden (Oh et al., 2006, A; Yi et al., 2005; Sheikh et al., 1993). Auch dies scheint ein interessanter Angriffspunkt für die Entwicklung von Zytostatika zu sein.

Auch als Prognosefaktoren für die Tertiärprophylaxe scheinen IGF1 und IGF-BP3 bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen wertvoll zu sein. Eine Erhöhung des Serumspiegels von IGF1 und eine Abweichung des Serumspiegels von IGF-BP3 nach oben oder unten sind mit einem erhöhten Risiko für ein Zweitkarzinom assoziiert (Wu et al., 2004). Dieses Risiko ist nicht unerheblich, es beträgt bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinom ca. 4-7 % per anno (Wu et al., 2004). Mit einem verlässlichen Prognosefaktor könnten Hochrisikopatienten identifiziert werden.

Erwähnenswert ist, dass bei Larynxkarzinomen grundsätzlich eine Tendenz zur Verminderung der Bildung von IGF1 beobachtet wurde. Ob bei Larynxkarzinomen dennoch die gleiche Wertigkeit der IGF1-Bestimmung für die Prognose vorliegt, wurde von den Autoren nicht bewertet.

5.3.3 Ausblick für onkologische Therapien im IR-System

In Anbetracht des IR/IGF-Verhältnisses wird davon ausgegangen, dass die Interaktion von IGF1 und 2 mit IR-A, dem IGF1R oder dem IR-A-Hybrid eine Rolle in der Karzinogenese spielt. Der IGF1-Rezeptor ist daher zu einem Zielobjekt in der onkologischen Forschung geworden. Verschiedene Ansätze der Hemmung von IGF1-R konnten bei diversen Tumoren Wachstumshemmung erzielen (García-Echeverría et al., 2004). Dazu gehören rezeptorblockierende Antikörper (Scotlandi et al., 1998), Inhibitoren der intrazellulären Tyrosinkinase (García-Echeverría et al., 2004), Einschleusung von antisense-Oligonukleotiden (White et al., 2000) und die Unterbringung von Genen, die für antimorphe oder dominant negative IGF1-R-Mutanten kodieren, wonach ein funktionsloser IGF1-Rezeptor entsteht (Reiss et al., 1998).

Man versuchte zunächst, selektiv den IGF1R zu blockieren, da eine Störung der metabolischen Funktionen durch Hemmung des IR befürchtet wurde. Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit zwischen dem Insulin- und dem IGF1-Rezeptor ist eine ausschließliche Hemmung von IGF1R allerdings nur schwer möglich. Weiterführende Studien an Mammakarzinomzellen zeigten, dass eine alleinige Hemmung von IGF1R zu einer verstärkten Expression von IR an der Zelloberfläche führt und außerdem die Insulinempfindlichkeit der Tumorzellen erhöht. Auf diese Weise sind die Zellen in der Lage, vermehrt Glucose aufzunehmen (Zhang et al., 2007). Weiterhin kann, wie zuvor dargelegt, bei Tumoren auch der IR mitogene Signale vermitteln (Zhang et al., 2007). Aus diesem Grund scheint eine Inhibierung beider Rezeptoren und ihres Hybrids ein wichtiger Ansatz in der onkologischen Forschung zu sein.

Eine gleichzeitige Hemmung von IGF1-R und dem Insulinrezeptor durch den Inhibitor BMS-554417 führte zu einer ausgeprägten Wachstumshemmung von diversen Karzinomzellen in vitro und in vivo am Mausmodell. Eine Blockade des IGF/IR-Hybridrezeptors könnte ebenso einen Therapieansatz darstellen, die Proliferation von Karzinomen zu verzögern. Um die Glukoseaufnahme in die Tumorzellen zu reduzieren und somit ihr Proliferationspotential einzuschränken, wurden bereits in-vitro-Versuche mit einem Glukoseanalogon unternommen (Zhu et al., 2005).

5.4 LOXL4

5.4.1 Lokalisation und Funktion der Lysyl-Oxidasen

Beim vierten in dieser Arbeit untersuchten Gen handelt es sich um das LOXL4-Gen, welches das jüngste Mitglied der LOX-Genfamilie darstellt. Den LOX-Genen ist gemeinsam, dass sie für Kupfer-abhängige Amin-Oxidasen kodieren, die die Quervernetzung von Kollagen und Elastin in der extrazellulären Matrix katalysieren (Asuncion et al., 2001; Mäki und Kivirikko, 2001; Kim et al., 2003). Die c-terminale Region von LOXL4 enthält konservierte Domänen, die große Ähnlichkeiten mit den Domänen anderer LOX-Isoformen aufweisen, welche am Aufbau eines Lysyl-Tyrosyl-Quinon-Cofaktors beteiligt sind. Die N-terminale Region beinhaltet 4 scavenger receptor cystein rich domains (SRCR), die bei LOXL2 und LOXL3 ähnlich aufgebaut sind (Asuncion et al., 2001; Mäki und Kivirikko, 2001).

5.4.2 Lysyl-Oxidasen bei malignen Tumoren

Die meisten Genexpressionsstudien bei malignen Tumoren beziehen sich auf LOX, während LOXL4 bislang noch weniger untersucht wurde. Die an LOX gewonnenen Ergebnisse scheinen bei verschiedenen Tumorentitäten widersprüchlich zu sein. Größere Studien an Magen-, Darm-, Prostata- und Mammakarzinom zeigten sowohl erhöhte als auch reduzierte LOX-Expressionen, wobei bei Magenkarzinomen letzteres durch Methylierung und bei Darmkrebs durch Mutation zu erklären war (Kaneda et al., 2004; Csiszar et al., 2002; Ren et al., 1998; Kirschmann et al., 2002). Es wurde daraufhin die Hypothese aufgestellt, dass intrazelluläres und extrazelluläres LOX völlig unterschiedliche Funktionen aufweisen könnten. In einer größeren Studie von Erler und Mitarbeitern wurde an 295 Brustkrebspatientinnen eine Korrelation zwischen LOX-Expression und zellulärer Hypoxie gezeigt (Erler et al., 2006). Zusätzlich hatten Patienten mit positiver LOX-Expression ein signifikant verringertes Gesamtüberleben. Nach anderen Berichten hingegen wurden bei Magenkarzinomen, metastasierten Prostata-, Ösophaguskarzinomen, Basalzell- und

Plattenepithelkarzinomen der Haut sowie bei Karzinomen des Kopf-Hals-Bereichs eine verminderte LOX-Expression gefunden (Kaneda et al., 2004; Ren et al., 1998; He et al., 2002; Bouez et al., 2006; Rost et al., 2003).

Erste Hinweise, dass LOXL4 in Kopf-Hals-Karzinomen überexprimiert ist und so vermutlich weitere Funktionen von LOXL4 im Zusammenhang mit der Tumorentstehung vorliegen könnten, sind 2003 von Holtmeier und Mitarbeitern postuliert worden (Holtmeier et al., 2003). Sie stellten eine signifikant erhöhte LOXL4-mRNA-Expression in Abhängigkeit von Tumortyp und –lokalisation fest. Außerdem wurde eine signifikant hohe Korrelation zwischen LOXL4-mRNA-Expression und dem Tumorstadium beobachtet, wo hingegen keine Korrelation zwischen der LOXL4-mRNA-Expression und dem histopathologischen Grading bestand. In der Mehrzahl der normalen epithelialen Zellkulturen konnte keine LOXL4-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen legen nahe, dass die LOXL4-Expression wahrscheinlich kein initiales Ereignis in der Karzinogenese von Kopf-Hals-Karzinomen darstellt, sondern eher einen Zustand während der Tumorprogression reflektiert.

In einer großen Kohorte von Primärtumoren und Halslymphknotenmetastasen wurde LOXL4 in Abhängigkeit von verschiedenen klinischen und histopathologischen Faktoren untersucht (Weise et al., 2008, A). Die Expressionsverteilung zeigte in Abhängigkeit von der Organlokalisation keine großen Unterschiede. Über 90 % der untersuchten Tumoren waren LOXL4-positiv. Im Gegensatz dazu waren alle Proben von gesunder Mundschleimhaut LOXL4-negativ, so dass LOXL4 als molekularer Marker in der Diagnostik von primären und metastasierenden Kopf-Hals-Karzinomen verwendet werden könnte. Zusätzlich könnte die hohe Anzahl der Lymphknotenmetastasen, die mit einer LOXL4-Überexpression korrelierte, für eine Funktion von LOXL4 in der Tumorzellstreuung und in der Tumorausbreitung sprechen (Weise et al., 2008, B). Eine Analyse von Fernmetastasen würde diesen Zusammenhang vermutlich weiter erhärten. Eine ausreichende Anzahl an Gewebeproben von Fernmetastasen von Patienten, die nicht mit Radioatio oder Chemotherapie behandelten wurden, liegt für wissenschaftliche Fragestellungen äußerst selten vor.

Bemerkenswert ist auch, dass keine Biopsate, die aus einem benignen Tumor entnommen wurden (2 Papillome, 2 Adenome), LOXL4 exprimierten. Hingegen belief sich bei diesen die Expression von EGFR auf 50 %, von IR auf 100 % und von JNK3 auf 0 %. Ein Vergleich mit der Expression bei malignen Tumoren zeigte, dass diese drei Gene keinen signifikanten Expressionsunterschied zwischen benignen und malignen Tumoren aufweisen. Die Bestimmung von LOXL4 könnte daher zur Unterscheidung von benignen und malignen Tumoren dienen.

Die aufgeführten Daten zeigen weiterhin, dass ein hoher Anteil maligner Proben, die LOXL4 exprimieren, auch ein hohes Maß an IR exprimieren, wenn auch statistisch nicht signifikant ($p = 0,2$). Hierbei wäre verfolgenswert, ob sich diese Tendenz bei einer Untersuchung an einem größeren Kollektiv bestätigen könnte und ob sich daraus ein möglicher prognostischer Wert ableiten ließe.

5.5 Schlussfolgerung

In Hinblick auf die Verwertbarkeit der vier Gene als Marker für Kopf-Hals-Karzinome ergeben sich folgende Überlegungen:

Der IR ist in ein interessantes Signaltransduktionsnetz eingebunden, welches typische Veränderungen bei Kopf-Hals-Karzinomen aufweist. Hier sind insbesondere, wie oben aufgeführt, erhöhte IGF1- und IGF-BP3-Spiegel bei Diagnosestellung Hinweise auf ein zukünftiges Zweitmalignom und könnten somit einen prognostischen Faktor darstellen.

Bei keinem der hier untersuchten Gene konnte ein Zusammenhang zwischen ihrer Expression und dem Tumorstadium nachgewiesen werden. Für LOXL4 existieren inzwischen Untersuchungen, nach denen die Expression signifikant mit Befall der regionären Lymphknoten ansteigt (Weise et al., 2008, B).

Möglicherweise sind LOXL4, IR, JNK3 und EGFR als prognostische Marker weniger geeignet als IGF1 und IGF-BP3, die in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht wurden. LOXL4 stellt nach dieser Untersuchung ein probates Unterscheidungsmerkmal zwischen malignen und benignen epithelialen Tumoren dar.

Auffällig ist, dass die JNKs in verschiedenen Veröffentlichungen widersprüchlicherweise sowohl über- als auch unterexprimiert werden (s.o.). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass hier verschiedene Tumorentitäten und damit unterschiedliche Zellarten untersucht wurden. Die Rezeptoren und Proteine sind dort möglicherweise jeweils in unterschiedliche Signalnetzwerke eingebunden, die noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Auch von LOXL4 existiert ein Bericht, der die Unterexpression bei Blasenkarzinomen feststellt (Wu et al., 2007). Die wenigen Artikel über die Expression bei Kopf-Hals-Karzinomen stellen aber einheitlich die Überexpression von LOXL4 fest.

LOXL4 ist ein vielversprechendes, erst seit kurzer Zeit entdecktes Antigen, welches von Weise und Mitarbeitern bereits für die Herstellung einer Tumorstoffimpfung verwendet wurde (Weise et al., 2008, A). Allerdings sind Vakzinierungen oder andere Inhibitionsmechanismen nur sinnvoll, wenn LOXL4 als Bestandteil einer Kausalkette mitverantwortlich für die Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen gemacht werden kann und seine Überexpression weder ein Epiphänomen noch einen Schutzmechanismus darstellt. Sollte sich weiterhin herausstellen, dass sowohl die Aktivierung von LOXL4 bei Kopf-Hals-Karzinomen als auch die Reprimierung von LOXL4 bei Blasenkarzinomen in der Tumorentstehung eine zentrale Rolle spielen, wäre eine therapeutische Beeinflussung des Expressionslevels schwierig zu handhaben.

In der Gesamtbetrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit lässt sich schlussfolgern, dass die veränderte Expression der untersuchten Gene in der Pathogenese der Kopf-Hals-Karzinome eine relevante Rolle spielt.

6 Zusammenfassung

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die differentielle Expression von den vier Genen EGFR, JNK3, IR und LOXL4 in 58 Biopsaten von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich zu analysieren. Hierzu wurde aus den Homogenaten von schockgefrorenen Karzinombiopsaten die RNA extrahiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion der einzelnen Gene erfolgte mit der Northern-Hybridisierungsmethode und durch den Einsatz DIG-markierter genspezifischer Sonden. Zum Vergleich der Expressionshöhe dieser Gene wurden gesunde Schleimhautbiopsate und Epithelzellkulturen des oberen Aerodigestivtraktes simultan untersucht und das Expressionsprofil der einzelnen Gene untereinander verglichen. Als Bewertungsmaßstab diente die Expressionsbestimmung des konstitutionell exprimierten Gens GAPDH. Die Auswertung erfolgte unter Berücksichtigung von verschiedenen klinisch-histopathologischen Parametern wie TNM-Stadium, Geschlecht der Patienten und ihr Alter bei Biopsatentnahme.

LOXL4 und EGFR wurden bei den Karzinomproben überexprimiert und JNK3 reprimiert. LOXL4 war positiv bei 71 % der untersuchten Karzinombiopsaten und bei 9 % der benignen Proben ($p = 0,0002$). EGFR wurde bei 78 % der malignen und 36 % der benignen Proben exprimiert ($p = 0,01$) und JNK3 bei 12 % der malignen und 45 % der benignen Proben ($p = 0,02$). Der Unterschied bei der IR-Expression war nicht signifikant (79 % positive maligne, 73 % positive benigne Proben, $p = 0,7$).

Der Unterschied zu benignen Proben war bei LOXL4 am deutlichsten. Die Bestimmung der LOXL4-Expression könnte demnach in Grenzfällen einen Beitrag zur Klärung der Dignität von Kopf-Hals-Tumoren beisteuern. Eine simultane Analyse von zwei der vier untersuchten Gene ist nicht erforderlich, da dadurch das Merkmal für Tumorspezifität nicht erhöht wird. Der Nachweis der IR-Expression liefert keinen Hinweis für Tumorspezifität, da dieses Gen auch in gesunden Zellen stark exprimiert wurde.

Bei keinem der hier untersuchten Gene konnte ein Zusammenhang zwischen ihrer Expression und dem Tumorstadium nachgewiesen werden, auch wenn für LOXL4 inzwischen Untersuchungen vorliegen, nach denen die Expression signifikant mit Befall der regionären Lymphknoten ansteigt. Unter Zuhilfenahme des LOXL4-Antigens wird gegenwärtig eine Tumorstudie entwickelt. Aktuelle Tumorthapie-Ansätze richten sich bereits gegen das EGFR-, das JNK3- und das IR/IGF1R-System.

7 Literaturverzeichnis

Ahmed, S. M., Cohen, E. E. (2007):

Treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck in the metastatic and refractory settings: advances in chemotherapy and the emergence of small molecule epidermal growth factor receptor kinase inhibitors.

Curr Cancer Drug Targets 7, 666-73

Asuncion, L., Fogelgren, B., Fong, K. S., Fong, S. F., Kim, Y., Csiszar, K. (2001):

A novel human lysyl oxidase-like gene (LOXL4) on chromosome 10q24 has an altered scavenger receptor cysteine rich domain.

Matrix Biol. 20, 487-91

Barnes, C. J., Ohshiro, K., Rayala, S. K., El-Naggar, A. K., Kumar, R. (2007):

Insulin-like growth factor receptor as a therapeutic target in head and neck cancer.

Clin Cancer Res. 13, 4291-9

Barrandon, Y., Green, H. (1987):

Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor.

Cell 50, 1131-7

Belfiore, A. (2007):

The role of insulin receptor isoforms and hybrid insulin/IGF-I receptors in human cancer.

Curr Pharm Des. 13, 671-86

Berrino, F., Gatta, G. (1998):

Variation in survival of patients with head and neck cancer in Europe by the site of origin of the tumours.

Eur J Cancer 34, 2154-2161

- Bianco, R., Gelardi, T., Damiano, V., Ciardiello, F., Tortora, G. (2007):
Rational bases for the development of EGFR inhibitors for cancer treatment.
Int J Biochem Cell Biol 39, 1416-31
- Biolchini, F., Pollastri, G., Fiquerelli, S., Chiarini, L. (2005):
Carcinogen metabolism, DNA damage repair and oral head and neck squamocellular carcinoma (HNSCC). A review.
Minerva Stomatol. 54, 405-14
- Bleich, S., Kropp, S., Van Striptiaan, H. (1995):
Kanzergenese (S.77f) in:
Kurzlehrbuch Allgemeine Pathologie. Erstauflage, Schattauer Verlag, Stuttgart
- Böcker, W., Höfler, H., Denk, H., Heitz, Ph. U. (1997):
Allgemeine Tumorpathologie (S.174) in:
Pathologie. Erstauflage, Urban & Schwarzenberg, München, Deutschland
- Boonstra, J., De Laat, S. W., Ponc, M. (1985):
Epidermal growth factor receptor expression related to differentiation capacity in normal and transformed keratinocytes.
Exp Cell Res. 161, 421-33
- Bouez, C., Reynaud, C., Noblesse, E., Thépot, A., Gleyzal, C., Kanitakis, J., Perrier, E., Damour, O., Sommer, P. (2006):
The lysyl oxidase LOX is absent in basal and squamous cell carcinomas and its knockdown induces an invading phenotype in a skin equivalent model.
Clin Cancer Res. 12, 1463-9
- Bulavin, D. V., Fornace, A. L. Jr. (2004):
p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor.
Adv Cancer Res. 92, 95-118

Burtneß, B. (2005):

The role of cetuximab in the treatment of squamous cell cancer of the head and neck.
Expert Opin Biol Ther. 5, 1085-93

Chang, H. W., Ling, G. S., Wie, W. I., Yuen, A. P. (2004):

Smoking and drinking can induce p15 methylation in the upper aerodigestive tract of healthy individuals and patients with head and neck squamous cell carcinoma.
Cancer. 101, 125-32.

Chen, Y. R., Tan, T. H. (2000):

The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling (review).
Int J Oncol. 16, 651-62

Chen, W. S., Lazar, C. S., Poenie, M., Tsien, R. Y., Gill, G. N., Rosenfeld, M. G. (1987):

Requirement for intrinsic protein tyrosine kinase in the immediate and late actions of the EGF receptor.
Nature 328, 820-3

Christensen, M. E. (1998):

The EGF receptor system in head and neck carcinomas and normal tissues.
Immunohistochemical and quantitative studies.
Dan Med Bull. 45, 121-34

Christensen, M. E., Engbaek, F., Therkildsen, M. H., Bretlau, P., Nexø, E. (1995):

A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay used for quantitation of epidermal growth factor receptor protein in head and neck carcinomas: evaluation, interpretations and limitations.
Br J Cancer 72, 1487-93

Christensen, M. E., Therkildsen, M. H., Poulsen, S. S., Bretlau, P. (1993):

Immunoreactive transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in oral squamous cell carcinomas.
J Pathol. 169, 323-8

Csiszar, K. (2001):

Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family.

Pr Og Nucleic Acid Res Mol Biol. 70, 1-32

Csiszar, K., Fong, S. F., Ujfalusi, A., Krawetz, S. A., Salvati, E. P., Mackenzie, J. W., Boyd, C. D. (2002):

Somatic mutations of the lysyl oxidase gene on chromosome 5q23.1 in colorectal tumors.

Int J Cancer. 97, 636-642.

Curtin, J. F., Cotter, T. G. (2002):

Anisomycin activates JNK and sensitises DU 145 prostate carcinoma cells to Fas mediated apoptosis.

Br J Cancer. 87, 1188-94

Dickinson, R. J., Keyse, S. M. (2006):

Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases.

J Cell Sci 119, 4607-15

Erler, J. T., Bennewith, K. L., Nicolau, M., Dornhöfer, N., Kong, C., Le, Q. T.,

Chi, J. T., Jeffrey, S. S., Giaccia, A. J. (2006):

Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis.

Nature 440, 1222-6.

Frasca, F., Pandini, G., Scalia, P., Sciacca, L., Mineo, R., Costantino, A., Goldfine, I. D., Belfiore, A., Vigneri, R. (1999):

Insulin Receptor Isoform A, a Newly Recognized, High-Affinity Insulin-Like Growth Factor II Receptor in Fetal and Cancer Cells.

Mol. Cell. Biol. 19, 3278-3288

García-Echeverría, C., Pearson, M. A., Marti, A., Meyer, T., Mestan, J., Zimmermann, J., Gao, J., Brueggen, J., Capraro, H. G., Cozens, R., Evans, D. B., Fabbro, D., Furet, P., Porta, D. G., Liebetanz, J., Martiny-Baron, G., Ruetz, S., Hofmann, F. (2004):
In vivo antitumor activity of NVP-AEW541-A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-IR kinase.
Cancer Cell. 5, 231-9

Gillison, M. L. (2004):
Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity.
Semin Oncol. 31, 744-54

Goillot, E., Raingeaud, J., Ranger, A., Tepper, R. I., Davis, R. J., Harlow, E., Sanchez, I. (1997):
Mitogen-activated protein kinase-mediated Fas apoptotic signaling pathway.
Proc Natl Acad Sci U S A 94, 3302-7

Goldstein, B. J. (1993):
Regulation of insulin receptor signaling by protein-tyrosine dephosphorylation.
Receptor 3, 1-15

Gollob, J. A., Wilhelm, S., Carter, C., Kelley, S. L. (2006):
Role of Raf kinase in cancer: therapeutic potential of targeting the Raf/MEK/ERK signal transduction pathway.
Semin Oncol. 33, 392-406

Goustin, A. S., Leof, E. B., Shipley, G. D., Moses, H. L. (1986):
Growth factors and cancer.
Cancer Research 46, 1015-29.

Gross, N. D., Boyle, J. O., Du, B., Kekatpure, V. D., Lantowski, A., Thaler, H. T., Weksler, B. B., Subbaramaiah, K., Dannenberg, A. J. (2007):
Inhibition of Jun NH2-terminal kinases suppresses the growth of experimental head and neck squamous cell carcinoma.

Clin Cancer Res. 13, 5910-7

Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Sluss, H. K., Dérijard, B., Davis, R. J. (1996):

Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors.

EMBO J. 15, 2760-70

Haley, J. D. (1990):

Regulation of epidermal growth factor receptor expression and activation: a brief review.

Symp Soc Exp Biol 44, 21-37

Haluska, P., Carboni, J. M., Loegering, D. A., Lee, F. Y., Wittman, M., Saulnier, M. G., Frennesson, D. B., Kalli, K. R., Conover, C. A., Attar, R. M., Kaufmann, S. H., Gottardis, M., Erlichman, C. (2006):

In vitro and in vivo antitumor effects of the dual insulin-like growth factor-I/insulin receptor inhibitor, BMS-554417.

Cancer Res. 66, 362-71

Hann, C. L., Brahmer, J. R. (2007):

"Who should receive epidermal growth factor receptor inhibitors for non-small cell lung cancer and when?"

Curr Treat Options Oncol. 8, 28-37

Harding, J., Burtneess, B. (2005):

Cetuximab: an epidermal growth factor receptor chemeric human-murine monoclonal antibody.

Drugs Today 41, 107-27

He, J., Tang, H. J., Wang, Y. Y., Xiong, M. H., Zhou, F., Shao, K., Li, T. P. (2002): Expression of lysyl oxidase gene in upper digestive tract carcinomas and its clinical significance.

Ai Zheng 21, 671-4.

Herbst, R. S., Hong, W. K. (2002):

IMC-C225, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for treatment of head and neck cancer.

Semin Oncol. 29, 18-30

Hoffman, H. T., Karnell, L. H., Funk, G. F., Robinson, R. A., Menck, H. R. (1998):

The National Cancer Data Base report on cancer of the head and neck.

Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 124, 951-62.

Holtmeier, C., Görögh, T., Beier, U., Meyer, J., Hoffmann, M., Gottschlich, S.,

Heidorn, K., Ambrosch, P., Maune, S. (2003):

Overexpression of a novel lysyl oxidase-like gene in human head and neck squamous cell carcinomas.

Anticancer Res. 23, 2585-91

Hommes, D. W., Peppelenbosch, M. P., van Deventer, S. J. (2003) :

Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets.

Gut. 52, 144-51

Hundley, T. R., Rigas, B. (2005):

Nitric oxide-donating aspirin inhibits colon cancer cell growth via mitogen-activated protein kinase activation.

J Pharmacol Exp Ther. 316, 25-34

- Hung, P. S., Kao, S. Y., Shih, Y. H., Chiou, S. H., Liu, C. J., Chang, K. W., Lin, S. C. (2008):
Insulin-like growth factor binding protein-5 (IGFBP-5) suppresses the tumourigenesis of head and neck squamous cell carcinoma.
J. Pathol. 214, 368-76
- Ip, Y. T., Davis, J. R. (1998):
Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) from inflammation to development.
Curr Opin Cell Biol. 10, 205-219
- Jahrreiß, H., Neuwirth, W. (1993):
Strahlungsgesetze (S.357) in:
Einführung in die Physik. 5. Auflage, Deutscher Ärzte-Verlag, Köln
- Kagan, H. M., Li, W. (2003):
Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell.
J. Cell Biochem. 88, 660-72
- Kagan, H. M., Trackman, P. C. (1991):
Properties and function of the lysyl oxidase.
Am J Respir Cell Mol Biol. 5, 206-210
- Kaneda, A., Wakazono, K., Tsukamoto, T., Watanabe, N., Yagi, Y., Tatematsu, M., Kaminishi, M., Sugimura, T., Ushijima, T. (2004):
Lysyl oxidase is a tumor suppressor gene inactivated by methylation and loss of heterozygosity in human gastric cancers.
Cancer Res. 64, 6410-5
- Kennedy, N. J., Davis, R. J. (2003):
Role of JNK in tumor development.
Cell Cycle 2, 199-201

Khazaie, K., Schirmacher, V., Lichtner, R. B. (1993):

EGF receptor in neoplasia and metastasis.

Cancer Metastasis Rev. 12, 255-74

Kim, H. J., Chakravarti, N., Oridate, N., Choe, C., Claret, F. X., Lotan, R. (2006):

N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis triggered by reactive oxygen species is mediated by activation of MAPKs in head and neck squamous carcinoma cells.

Oncogene. 25, 2785-94

Kim, M. S., Kim, S. S., Jung, S. T., Park, J. Y., Yoo, H. W., Ko, J., Csiszar, K., Choi, S. Y., Kim, Y. (2003):

Expression and purification of enzymatically active forms of the human lysyl oxidase-like protein 4.

J Biol Chem 278, 52071-4

Kirschmann, D. A., Seftor, E. A., Fong, S. F., Nieva, D. R., Sullivan, C. M.,

Edwards, E. M., Sommer, P., Csiszar, K., Hendrix, M. J. (2002):

A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion.

Cancer Res. 62, 4478-83

Kyriakis, J. M., Avruch, J. (1996):

Sounding the alarm: Protein kinase cascades activated by stress and inflammation.

J. Biol. Chem. 271, 24313-6

Lacouture, M. E., Melosky, B. L. (2007):

Cutaneous reactions to anticancer agents targeting the epidermal growth factor receptor: a dermatology-oncology perspective.

Skin Therapy Lett. 12, 1-5

Lander, H. M., Jacovina, A. T., Davis, R. J., Tauras, J. M. (1996):

Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species.

J Biol Chem. 271, 19705-9

- Lee, C. S., Redshaw, A., Boag, G. (1996):
TGF-alpha immunoreactivity in laryngeal carcinoma: lack of prognostic value and correlation to EGF-receptor expression.
Aust N Z J Surg. 66, 464-8
- Lee, C. S., Redshaw, A., Boag, G. (1997):
Epidermal growth factor receptor immunoreactivity in human laryngeal squamous cell carcinoma.
Pathology 29, 251-4
- Löffler, G. (2001):
Regulation von Wachstum und Differenzierung (S.461ff) in:
Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. 4. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg, Deutschland
- Losa, J. H., Parada Cobo, C., Viniegra, J. G., Sánchez-Arevalo Lobo, V. J., Ramón y Cajal, S., Sánchez-Prieto, R. (2003):
Role of the p38 MAPK pathway in cisplatin-based therapy.
Oncogene. 22, 3998-4006
- Lu, Z., Jiang, G., Blume-Jensen, P., Hunter, T. (2001):
Epidermal growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase.
Mol Cell Biol. 21, 4016-31
- Mäki, J. M., Kivirikko, K. I. (2001):
Cloning and characterization of a fourth human lysyl oxidase isoenzyme.
Biochem J. 355, 381-7.
- Maki, J. M., Sormunen, R., Lippo, S., Kaarteenaho-Wiik, Soininen, R., Myllyharju, J. (2005):
Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissues.
Am J Pathol. 167, 927-36

Maki, J. M., Tikkanen, H., Kivirikko, K. (2001):

Cloning and characterization of a fifth human lysyl oxidase isoenzyme: the fifth member of the lysyl oxidase-related subfamily with four scavenger receptor cysteine-rich domains.

Matrix Biolog. 20, 493-6

Mansouri, A., Ridgway, L. D., Korapati, A. L., Zhang, Q., Tian, L., Wang, Y., Siddik, Z. H., Mills, G. B., Claret, F. X. (2003):

Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells.

J Biol Chem. 278, 19245-56.

Masuda, M., Toh, S., Koike, K., Kuratomi, Y., Suzui, M., Deguchi, A., Komiyama, S., Weinstein, I. B. (2002):

The roles of JNK1 and Stat3 in the response of head and neck cancer cell lines to combined treatment with all-trans-retinoic acid and 5-fluorouracil.

Jpn J Cancer Res. 93, 329-39

Maune, S., Görögh, T. (2000):

Detection of overexpression of insulin receptor gene in laryngeal carcinoma cells by using differential display method.

Laryngorhinootologie 79, 438-41

Mielke, K., Herdegen, T. (2000):

JNK and p38 stresskinases--degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system.

Prog Neurobiol. 61, 45-60

Molnar, J., Fong, K. S., He, Q. P., Hayashi, K., Kim, Y., Fong, S. F., Fogelgren, B., Szauter, K. M., Mink, M., Csiszar, K. (2003):

Structural and functional diversity of lysyl oxidase and lox-like proteins.

Biochem Biophys Acta 11, 220-224

Morgillo, F., Lee, H. Y. (2006):

Lonafarnib in cancer therapy.

Expert Opin Investig Drugs. 15, 709-19

Mrhalova, M., Plzak, J., Betka, J., Kodet, R. (2005):

Epidermal growth factor receptor--its expression and copy numbers of EGFR gene in patients with head and neck squamous cell carcinomas.

Neoplasma. 52, 338-43.

Nielsen, C., Thastrup, J., Bøttzauw, T., Jäättelä, M., Kallunki, T. (2007):

c-Jun NH2-terminal kinase 2 is required for Ras transformation independently of activator protein 1.

Cancer Res. 67, 178-85

Nishida, E., Gotoh, Y. (1993):

The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways.

Trends Biochem Sci. 18, 128-31

Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M. R.,

Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F., Salomon, D. S. (2006):

Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer.

Gene 366, 2-16

Oh, S. H., Kim, W. Y., Kim, J. H., Younes, M. N., El-Naggar, A. K., Myers, J. N.,

Kies, M., Cohen, P., Khuri, F., Hong, W. K., Lee, H. Y. (2006), B:

Identification of insulin-like growth factor binding protein-3 as a farnesyl transferase inhibitor SCH66336-induced negative regulator of angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma.

Clin Cancer Res. 12, 653-61

Oh, S. H., Lee, O. H., Schroeder, C. P., Oh, Y. W., Ke, S., Cha, H. J., Park, R. W., Onn, A., Herbst, R. S., Li, C., Lee, H. Y. (2006), A:

Antimetastatic activity of insulin-like growth factor binding protein-3 in lung cancer is mediated by insulin-like growth factor-independent urokinase-type plasminogen activator inhibition.

Mole Cancer Ther. 5, 2685-95

Pandini, G., Vigneri, R., Costantino, A., Frasca, F., Ippolito, A., Fujita-Yamaguchi, Y., Siddle, K., Goldfine, I. D., Belfiore, A. (1999):

Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor overexpression in breast cancers leads to insulin/IGF-I hybrid receptor overexpression: evidence for a second mechanism of IGF-I signaling.

Clin Cancer Res. 5, 1935-44

Papachristou, D. J., Batistatou, A., Sykiotis, G. P., Varakis, I., Papavassiliou, A. G. (2003):

Activation of the JNK-AP-1 signal transduction pathway is associated with pathogenesis and progression of human osteosarcomas.

Bone. 32, 364-71

Payne, S. L., Hendrix, M. J., Kirschmann, D. A. (2007):

Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer--a prospect.

J Cell Biochem. 101, 1338-54

Pelech, S. L., Charest, D. L., Mordret, G. P., Siow, Y. L., Palaty, C., Campbell, D.,

Charlton, L., Samiei, M., Sanghera, J. S. (1993):

Networking with mitogen-activated protein kinases.

Moll Cell Biochem. 127, 157-59

Prisco, M., Hongo, A., Rizzo, M. G., Sacchi, A., Baserga, R. (1997):

The insulin-like growth factor I receptor as a physiologically relevant target of p53 in apoptosis caused by interleukin-3 withdrawal.

Mol Cell Biol. 17, 1084-92

Reiss, K., D'Ambrosio, C., Tu, X., Tu, C., Baserga, R. (1998):
Inhibition of tumor growth by a dominant negative mutant of the insulin-like growth factor I receptor with a bystander effect.

Clin Cancer Res. 4, 2647-55

Ren, C., Yang, G., Timme, T. L., Wheeler, T. M., Thompson, T. C. (1998):
Reduced lysyl oxidase messenger RNA levels in experimental and human prostate cancer.

Cancer Res. 58, 1285-90

Robinson, M. J., Cobb, M. H. (1997):
Mitogen-activated protein kinase pathways.

Curr Opin Cel Biol. 9, 180-6.

Rodriguez, C., Raposo, B., Martinez-Gonzalez, J., Casani, L., Badimon, L. (2002):
Low density lipoproteins downregulate lysyl oxidase in vascular endothelial cells and the arterial wall.

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 22, 1409

Rossi, A., Bria, E., Maione, P., Palazzolo, G., Falanga, M., Gridelli, C. (2008):
The role of cetuximab and other epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in the treatment of advanced non-small cell lung cancer.

Rev Recent Clin Trials. 3, 217-27

Rost, T., Pyritz, V., Rathcke, I. O., Görögh, T., Dünne, A. A., Werner, J. A. (2003):
Reduction of LOX- and LOXL2-mRNA expression in head and neck squamous cell carcinomas.

Anticancer Res. 23, 1565-73.

Rubin Grandis, J., Chakraborty, A., Melhem, M. F., Zeng, Q., Tweardy, D. J. (1997):
Inhibition of epidermal growth factor receptor gene expression and function decreases proliferation of head and neck squamous carcinoma but not normal mucosal epithelial cells.

Oncogene 15, 409-16

Rubin Grandis, J., Melhem, M. F., Gooding, W. E., Day, R., Holst, V. A., Wagener, M. M., Drenning, S. D., Tweardy, D. J. (1998):

Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival.

J natl Cancer Inst 90, 824-32

Rucker, R. B., Kosonen, T., Clegg, M. S., Mitchell, A. E., Rucker, B. R., Uriu-Hare, J. Y., Keen, C. L. (1998):

Copper, lysyl oxidase, and extracellular matrix protein cross-linking.

Am J Clin Nutr. 67, 996-1002

Saffran, S., Gorogh, T., Lippert, B. M., Werner, J. A. (1997):

Kultivierung humaner Keratinozyten der Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes. *Laryngo-Rhino-Otologie.* 76, 101-105.

Sako, Y., Minoghchi, S., Yanagida, T. (2000):

Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells.

Nat Cell Biol. 2, 168-72.

Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F., Normanno, N. (1995):

Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies.

Crit Rev Oncol Hematol. 19, 183-232.

Schwab, W. (1994):

(S.247) in: *Atlas der Kopf-/Hals-Chirurgie*, Kohlhammer Verlag, Stuttgart

Sciacca, L., Costantino, A., Pandini, G., Mineo, R., Frasca, F., Scalia, P., Sbraccia, P., Goldfine, I. D., Vigneri, R., Belfiore, A. (1999):

Insulin receptor activation by IGF-II in breast cancers: evidence for a new autocrine/paracrine mechanism.

Oncogene 18, 2471-9.

Scotlandi, K., Benini, S., Nanni, P., Lollini, P. L., Nicoletti, G., Landuzzi, L., Serra, M., Manara, M. C., Picci, P., Baldini, N. (1998):

Blockage of insulin-like growth factor-I receptor inhibits the growth of Ewing's sarcoma in athymic mice.

Cancer Res. 58, 4127-31

Sebolt-Leopold, J. S., Dudley, D. T., Herrera, R., Van Becelaere, K., Wiland, A., Gowan, R. C., Tecle, H., Barrett, S. D., Bridges, A., Przybranowski, S., Leopold, W. R., Saltiel, A. R. (1999):

Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo.

Nat Med. 5, 810-6

Seta, K. A., Kovacina, K. S., Roth, R. A. (1993):

The insulin receptor family.

Adv Exp Med Biol. 343, 113-124

Sheikh, M. S., Shao, Z. M., Hussain, A., Clemmons, D. R., Chen, J. C., Roberts, C. T. Jr, LeRoith, D., Fontana, J. A. (1993):

Regulation of insulin-like growth factor-binding-protein-1, 2, 3, 4, 5, and 6: synthesis, secretion, and gene expression in estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells.

J Cell Physiol. 155, 556-67

Slomiany, M. G., Black, L. A., Kibbey, M. M., Day, T. A., Rosenzweig, S. A. (2006):

IGF-1 induced vascular endothelial growth factor secretion in head and neck squamous cell carcinoma.

Biochem Biophys Res Commun. 342, 851-8

Slomiany, M. G., Black, L. A., Kibbey, M. M., Tingler, M. A., Day, T. A., Rosenzweig, S. A. (2007):

Insulin-like growth factor-1 receptor and ligand targeting in head and neck squamous cell carcinoma.

Cancer Lett. 248, 269-79

- Sluss, H. K., Barrett, T., Dérijard, B., Davis, R. J. (1994):
Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases.
Mol Cell Biol. 14, 8376-84
- St-Arnaud, R., Chabot, J. G., Pelletier, G., Labrie, F., Walker, P. (1984):
Epidermal growth factor: structure, location, phosphorylation and regulation of its
receptor.
Biochimie 66, 515-30
- Syrjänen, K. J. (1990):
Papillomavirus infections, precancers and epidermoid cancers (S. 13ff) in:
*Monsonog, J. (ed.) Papillomaviruses in human pathology. Recent progress in
epidermoid precancers. Raven Pres, New York, USA*
- Szauter, K. M., Cao, T., Boyd, C. D., Csiszar, K. (2005):
Lysyl oxidase in development, aging and pathologies of the skin.
Pathol Biol. 53, 448-56
- Vella, V., Pandini, G., Sciacca, L., Mineo, R., Vigneri, R., Pezzino, V., Belfiore, A. (2002):
A novel autocrine loop involving IGF-II and the insulin receptor isoform-A stimulates
growth of thyroid cancer.
J Clin Endocrinol Metab. 87, 245-54
- Vella, V., Sciacca, L., Pandini, G., Mineo, R., Squatrito, S., Vigneri, R., Belfiore, A. (2001):
The IGF system in thyroid cancer: new concepts.
Mol Pathol. 54, 121-4
- Weise, J. B., Csiszar, K., Gottschlich, S., Hoffmann, M., Schmidt, A., Weingartz, U.,
Adamzik, I., Heiser, A., Kabelitz, D., Ambrosch, P., Görögh, T. (2008), A:
Vaccination strategy to target lysyl oxidase-like 4 in dendritic cell based
immunotherapy for head and neck cancer.
Int J Oncol. 32, 317-22

Weise, J. B., Rudolph, P., Heiser, A., Kruse, M. L., Hedderich, J., Cordes, C., Hoffmann, M., Brant, O., Ambrosch, P., Csiszar, K., Görögh, T. (2008), B: LOXL4 is a selectively expressed candidate diagnostic antigen in head and neck carcinoma.

Eur J Cancer. 44, 1323-31.

Wells, A. (1999):

EGF receptor.

Int J Biochem Cell Biol 31, 637-43

Weston, C. R., Davis, R. J. (2002):

The JNK signal transduction pathway.

Curr Opin Genet Dev. 12, 14-21

White, P. J., Fogarty, R. D., Werther, G. A., Wraight, C.J. (2000):

Antisense inhibition of IGF receptor expression in HaCaT keratinocytes: a model for antisense strategies in keratinocytes.

Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 10, 195-203

Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., Johnson, G. L. (1999):

Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human.

Physiol Rev. 79, 143-80

Wu, G., Guo, Z., Chang, X., Kim, M. S., Nagpal, J. K., Liu, J., Maki, J. M., Kivirikko, K. I., Ethier, S. P., Trink, B., Sidransky, D. (2007):

LOXL1 and LOXL4 are epigenetically silenced and can inhibit ras/extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in human bladder cancer.

Cancer Res. 67, 4123-9.

Wu, X., Zhao, H., Do, K. A., Johnson, M. M., Dong, Q., Hong, W. K., Spitz, M. R. (2004):

Serum levels of insulin growth factor (IGF-I) and IGF-binding protein predict risk of second primary tumors in patients with head and neck cancer.

Clin Cancer Res. 10, 3988-95

Yi, H. K., Kim, S. Y., Hwang, P. H., Kim, C. Y., Yang, D. H., Oh, Y., Lee, D. Y. (2005):
Impact of PTEN on the expression of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-
binding proteins in human gastric adenocarcinoma cells.

Biochem Biophys Res Commun. 330, 760-7

Yoshida, S., Fukino, K., Harada, H., Nagai, H., Imoto, I., Inazawa, J., Takahashi, H.,
Teramoto, A., Emi, M. (2001):

The c-Jun NH2-terminal kinase3 (JNK3) gene: genomic structure, chromosomal
assignment, and loss of expression in brain tumors.

J Hum Genet. 46,182-7

Zhang, H., Yee, D. (2004):

The therapeutic potential of agents targeting the type I insulin-like growth factor
receptor.

Expert Opin Investig Drugs. 13, 1569-77.

Zhang, H., Pelzer, A. M., Kiang, D. T., Yee, D. (2007):

Down-regulation of type I insulin-like growth factor receptor increases sensitivity of
breast cancer cells to insulin.

Cancer Res. 67, 391-7

Zhu, Z., Jiang, W., McGinley, J. N., Thompson, H. J. (2005):

2-Deoxyglucose as an energy restriction mimetic agent: effects on mammary
carcinogenesis and on mammary tumor cell growth in vitro.

Cancer Res. 65, 7023-30

Zur Hausen, H. (1989):

Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in
human cancers.

Cancer Res. 49, 4677-81.

8 Anhang

Tabellen 8-1 bis 8-8: TNM-Stadieneinteilung nach UICC¹, 2002

Tabelle 8-1 *T-Stadien beim supraglottischen Larynxkarzinom*

Stadium	Definition
Tx	Tumor kann nicht beurteilt werden
T1	Tumor auf die Schleimhaut von einem Unterbezirk der Supraglottis begrenzt, Stimmbänder normal beweglich
T2	Schleimhaut von mehr als einem Unterbezirk von Supraglottis/Glottis befallen oder eines Areals außerhalb des Larynx (z.B. Zungengrund), Stimmbänder normal beweglich
T3	Ausdehnung begrenzt auf Larynx mit Stimmbandfixation und/oder Invasion des Postkrikoidbezirkes oder von präepiglottischem Gewebe und/oder geringgradige Erosion des Schildknorpels (innerer Kortex)
T4	Ausbreitung durch den Schildknorpel und/oder in die umgebenden Weichteile

Tabelle 8-1 nach: Schmoll, Höffken, Possinger (2006). Larynxkarzinom, in: Kompendium Internistische Onkologie, 4. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg.

Tabelle 8-2 *T-Stadien beim glottischen Larynxkarzinom*

Stadium	Definition
Tx	Tumor kann nicht beurteilt werden
T1	Tumor auf die Stimmbänder begrenzt, Stimmbänder normal beweglich
T2	Ausdehnung auf Supra- und/oder Subglottis und/oder eingeschränkte Beweglichkeit der Stimmbänder
T3	Stimmlippenfixation und/oder Invasion der Postcricoidgegend und/oder des paraglottischen Gewebes und/oder des paraglottischen Raumes mit geringgradiger Erosion des Schildknorpels (innerer Kortex)
T4	Ausbreitung durch den Schildknorpel und/oder in die umgebenden Weichteile

Tabelle 8-2 nach: Schmoll, Höffken, Possinger (2006). Larynxkarzinom, in: Kompendium Internistische Onkologie, 4. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg.

¹Union Internationale Contre le Cancer

Tabelle 8-3 T-Stadien beim subglottischen Larynxkarzinom

Stadium	Definition
Tx	Tumor kann nicht beurteilt werden
T1	Ausdehnung auf die subglottische Region begrenzt
T2	Ausdehnung auf ein Stimmband oder beide Stimmbänder, normale oder eingeschränkte Beweglichkeit der Stimmbänder
T3	Ausdehnung noch innerhalb des Larynx, Stimmbandfixation
T4	Ausdehnung jenseits des Larynx.

Tabelle 8-3 nach: Schmoll, Höffken, Possinger (2006). Larynxkarzinom, in: Kompendium Internistische Onkologie, 4. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg.

Tabelle 8-4 T-Stadien beim Hypopharynxkarzinom

Stadium	Definition
Tx	Tumor kann nicht beurteilt werden
T1	Tumor auf einen Unterbezirk des Hypopharynx begrenzt, bis 2 cm in größter Ausdehnung
T2	Mehr als ein Unterbezirk des Hypopharynx befallen oder ein benachbarter Bezirk, zwischen 2 cm und 4 cm in größter Ausdehnung, ohne Fixation des Hemilarynx
T3	Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung oder Fixation des Hemilarynx
T4	Infiltration von Nachbargewebe

Tabelle 8-4 nach: Schmoll, Höffken, Possinger (2006). Hypopharynxkarzinom, in: Kompendium Internistische Onkologie, 4. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg.

Tabelle 8-5 T-Stadien beim Oropharynxkarzinom (einschließlich Zungengrundkarzinom und Tonsillen)

Stadium	Definition
Tx	Tumor kann nicht beurteilt werden
T1	Tumor bis 2 cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor zwischen 2 cm und 4 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T4	Infiltration von Nachbargewebe

Tabelle 8-5 nach: Schmoll, Höffken, Possinger (2006). Oropharynxkarzinom, in: Kompendium Internistische Onkologie, 4. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg.

Tabelle 8-6 T-Stadien beim Nasennebenhöhlenkarzinom im Sinus maxillaris

Stadium	Definition
Tx	Tumor kann nicht beurteilt werden
T1	Tumor ist auf die Schleimhaut des Sinus begrenzt, keine Knochenerosion
T2	Tumor verursacht Knochenerosion oder -destruktion; auch Invasion ins Palatum durum oder Meatus nasi medius, keine Invasion in die posteriore Sinuswand oder den Processus pterygoideus
T3	Invasion in einen der folgenden Bereiche: knöcherne Hinterwand des Sinus maxillaris, Subkutangewebe, mediale Wand/Boden der Orbita, Fossa pterygoidea, Cellulae ethmoidales
T4	Invasion in einen der folgenden Bereiche: vordere Orbitawand, Wangenhaut, Processus pterygoideus, Fossa infratemporalis, Lamina cribrosa, Sinus sphenoidalis, Sinus frontalis, Apex der Orbita, Dura mater, Gehirn, mittlere Schädelgrube, Hirnnerven außer Nervus maxillaris, Nasopharynx, Clivus

Tabelle 8-6 nach: Barnes, Eveson, Reichart, Sidransky (Hrsg., 2005). Tumours of the Nasal Cavity and Paranasal Sinuses, in: World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours, IARC Press, Lyon, Frankreich

Tabelle 8-7 N-Stadien bei allen aufgeführten Tumoren

Stadium	Definition
Nx	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in solitärem ipsilateralen Lymphknoten, kleiner als 3 cm in größter Ausdehnung
N2	Metastase in solitärem ipsilateralen Lymphknoten, zwischen 3 cm und 6 cm in größter Ausdehnung, oder Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, unter 6 cm in größter Ausdehnung, oder Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, unter 6 cm in größter Ausdehnung
N3	Metastasen in Lymphknoten mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
Anmerkung	In der Mittellinie gelegene Lymphknoten gelten als ipsilateral

Tabelle 8-7 nach: Schmoll, Höffken, Possinger (2006). Larynxkarzinom, in: Kompendium Internistische Onkologie, 4. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg.

Tabelle 8-8 ***M-Stadien bei allen Tumoren***

Stadium	Definition
Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 8-8 nach: Schmoll, Höffken, Possinger (2006). Larynxkarzinom, in: Kompendium Internistische Onkologie, 4. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg.

9 Danksagung

Frau Prof. Dr. P. Ambrosch, Direktorin der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, danke ich für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit anzufertigen.

Herrn Priv. Doz. Dr. T. Görögh aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel danke ich besonders herzlich für die Überlassung des Themas, seiner Hilfe bei der Einarbeitung in die verschiedenen molekularbiologischen Techniken, seine stetige Unterstützung bei der Durchführung, seine zahlreichen wertvollen Vorschläge und Anregungen zur Gestaltung dieser Dissertation und sein unermüdliches Engagement.

Mein Dank gilt den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern im Labor für experimentelle Onkologie der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, besonders Anne-Marie Roen.

Dr. rer. nat. Claudia Holtmeier danke ich für viele wertvolle Anregungen und Ratschläge bei der Durchführung des experimentellen Teils.

Ich danke herzlich meinen lieben Eltern, die mit kritischem Auge diese Dissertation korrigiert haben.

Und nicht zuletzt danke ich meinen Arbeitskollegen der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Ruhr-Universität Bochum, die mit mir gleichzeitig die Höhen und Tiefen der Verfassung einer Inauguraldissertation durchschritten.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Nina Simone Scola
geb. am 28.01.1980 in Hamburg

Beruflicher Werdegang

2006 bis heute Assistenzärztin in der Klinik für Dermatologie und Allergologie
der Ruhr-Universität Bochum

Hochschulausbildung

2001 bis 2006 Studium der Humanmedizin an der CAU Kiel,
Abschluss mit der Gesamtnote 1,66

5/2006 Drittes Staatsexamen, Note 1

3/2005 Zweites Staatsexamen, Note 1,66

3/2003 Erstes Staatsexamen, Note 3

1999 bis 2001 Studium der Humanmedizin an der RWTH Aachen

8/2001 Physikum, Note 2,66

Praktisches Jahr

3. Tertial Dermatologie bei Prof. Schwarz, Universitätsklinik Kiel

2. Tertial Innere Medizin bei Prof. Machraoui, Diako Flensburg

1. Tertial Chirurgie bei Prof. Vogel, Städtisches Krankenhaus Kiel

Veröffentlichung

Görögh T., Berwig J., Scola N., Lippert B. M. (2004)
Differential regulation of MAPK (JNK 3) gene expression in human head and neck
squamous cell carcinomas.
Oncology, 27, 353-7

Schulbildung

1992-1999 Gymnasium Hittfeld
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Note 1,6

7/1996-1/1997 Naperville North High School, Illinois, USA

1990-1992 Orientierungsstufe Hittfeld

1986-1990 Grundschule Ramelsloh

Die Inauguraldissertation wurde von 2004 bis 2009 erstellt.